DIE TAXONOMIE VON CORYNEFORMEN BAKTERIEN MIT UNGEWÖHNLICH QUERVERNETZTEN MUREINEN (GRUPPE B)

-.-.-

Eine Untersuchung der DNA-Homologie und rRNA-Cistron-Ähnlichkeit

Hannelore Döpfer

1981

Die Taxonomie von coryneformen Bakterien mit ungewöhnlich quervernetzten Mureinen (Gruppe B)

-.-.-

Eine Untersuchung der DNA-Homologie und rRNA-Cistron-Ähnlichkeit

Dissertation
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Hannelore Döpfer
aus
Nürnberg

Juni 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof.Dr.F.Fiedler
2. Berichterstatter: Prof.Dr.O.Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.1981

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite:
A.	Einleitung	1
B.	Material und Methoden	21
1.	Organismen, Stammhaltung und Reinheitskontrolle	21
2.	Nährmedien und Anzuchtbedingungen	24
2.1.	HD-Medium	24
2.2.	verarmtes HD-Medium	24
2.3.	halbsynthetisches Medium	25
2.4.	CASO-Bouillon	26
2.5.	TAM (= "terregens assay medium")	26
2.6.	Kultivierung der Organismen	26
3.	Zellwandpräparation	27
4.	Qualitative und quantitative Analyse der Zellwand-Aminosäuren und -Aminozucker	28
4.1.	Aminosäureanalysator	28
4.2.	Papierchromatographie	28
5.	Papierchromatographische Identifizierung der radioaktiven Komponenten im Medium während der Thymidinaufnahme	29
6.	Präparation hochmolekularer DNA	3o
6.1.	Zellaufschluß	3o
6.1.1.	Lysozymbehandlung	3o
6.1.2.	Mechanischer Aufschluß durch Frenchpress-Passage	31
6.2.	DNA-Reinigung	31
7.	Präparation radioaktiv markierter DNA	33
7.1.	Anzuchtbedingungen	33
7.2.	Zellaufschluß	33
7.3.	Fragmentierung	34

		Seite:
8.	Charakterisierung der DNA-Präparationen.....	34
8.1.	UV-Spektrum	34
8.2.	Bestimmung der DNA-Konzentration mit Diphenylamin	34
8.3.	Bestimmung der RNA-Konzentration mit Orcinol	35
8.4.	Bestimmung des Proteingehalts	36
8.5.	Bestimmung der spezifischen Aktivität von ^{3}H-markierter DNA	37
8.6.	Bestimmung des Molekulargewichts fragmentierter DNA	37
8.6.1.	Herstellung des Gels	38
8.6.2.	Elektrophorese und Auswertung	38
9.	Bestimmung des molaren Guanin + Cytosin-Gehalts der DNA	39
9.1.	Thermische Denaturierung von DNA	39
9.2.	Ermittlung des Denaturierungsverlaufs (Schmelzkurve)	4o
9.3.	Berechnung des G+C-Gehalts	4o
lo.	Beladen der Nitrocellulosefilter mit hochmolekularer DNA	42
lo.1.	Alkalische Denaturierung der DNA	42
lo.2.	Behandlung der Filter	42
lo.3.	Bestimmung der DNA-Menge pro Filter	43
11.	DNA/DNA-Hybridisierung	43
11.1.	Präinkubation der Filter	43
11.2.	Hitzedenaturierung der radioaktiven DNA	44
11.3.	Durchführung der Hybridisierung	44
11.4.	Berechnung der Homologiewerte	45
12.	Bestimmung des $T_{m(e)}$ der Hybride	46
13.	Präparation radioaktiv markierter rRNA	46
13.1.	Anzucht und Ernte der Zellen	47
13.2.	Zellaufschluß	47
13.3.	Herstellung des PAA-Gels	47

Seite:

13.4. Auftrennung der ^{3}H-rRNA-Arten 48
13.5. Elektroeluierung der RNA aus den PAA-Gelstücken 49
13.6. RNA-Isolierung nach Locker (1979) 5o
13.7. Vorbereitung der ^{3}H-rRNA zur Hybridisierung.. 51
14. DNA/rRNA-Hybridisierung 51
14.1. Reaktionsbedingungen 51
14.2. Durchführung der Hybridisierung 51
14.3. Nachbehandlung der Filter 52
15. Bestimmung des $T_{m(e)}$ der Hybride 52

C. Ergebnisse 53

1. Zellwandzusammensetzung der untersuchten Organismen 53
1.1. Gruppierung der untersuchten Stämme entsprechend ihrem Mureintyp 53
1.2. Auftreten nicht-obligater Zellwandkomponenten der B-Typ-Coryneformen 57
2. G+C-Gehalt der DNA 59
3. Versuche zur Gewinnung radioaktiv markierter DNA 6o
3.1. Aufnahne von Adenin und Thymidin bei Wachstum in "halbsynthetischem Medium" 61
3.2. Hemmung der Thymidin-Biosynthese durch 5-Fluor-Desoxyuridin 61
3.3. Einfluß der Medienzusammensetzung auf die Adenin- bzw. Thymidinaufnahme 62
3.4. Zugabe der radioaktiven Markierung zu wachsenden Zellen 65
3.5. Papierchromatographische Untersuchung der radioaktiven Komponenten im Medium 65
3.6. Erhöhung der ^{3}H-Adenin- bzw. ^{3}H-Thymidin-Konzentration im Medium 67
3.7. Effektivität der Reinigungsschritte im Verlauf der ^{3}H-DNA-Präparation von C.f.var.auran-tiacum 7o

Seite:

4.	Charakterisierung der DNA-Präparationen	72
4.1.	Reinheitskontrolle der hochmolekularen DNA ..	72
4.2.	Molekulargewicht von fragmentierter und hochmolekularer DNA	72
5.	DNA/DNA-Hybridisierungen	74
5.1.	Theoretische Überlegungen zur DNA/DNA-Hybridisierung	74
5.1.1.	Reaktionsmechanismus	74
5.1.2.	Beeinflussung des Reaktionsablaufs durch verschiedene Parameter	76
5.1.2.1.	Reaktionstemperatur	76
5.1.2.2.	Ionenstärke	77
5.1.2.3.	Zusatz von Formamid	78
5.1.2.4.	Viskosität	79
5.1.2.5.	Molekulargewicht der DNA_S	8o
5.1.2.6.	DNA-Konzentration	81
5.2.	Untersuchungen zu den Reaktionsbedingungen der DNA/DNA-Hybridisierungen	82
5.2.1.	Na^+- und FA-Konzentration	82
5.2.2.	Konzentration der DNA_S	86
5.2.3.	Menge der DNA_F	88
5.3.	DNA/DNA-Hybridisierungen bei coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe B	9o
5.3.1.	Gruppe I, Mureintyp [L-Lys] D-Glu - Gly - L-Lys	9o
5.3.2.	Gruppe IV,Mureintyp [L-Hsr] D-Glu - D-Orn ...	91
5.3.3.	Gruppe V, Mureintyp [L-Hsr] D-Glu - Gly - D-Orn	92
5.3.4.	Gruppe VI,Mureintyp [L-DAB] D-Glu - D-DAB	93
5.3.5.	Übersicht über die DNA-Homologiewerte zwischen Organismen der Gruppen I bis VI	94
6.	Schmelzpunktbestimmung der DNA/DNA-Hybride ...	95
6.1.	Theoretische Betrachtungen zur thermischen Stabilität von Nukleinsäure-Hybriden	95
6.1.1.	Definition des $T_{m(e)}$	96
6.1.2.	Abhängigkeit des $T_{m(e)}$ von der Art der Helixstruktur	96

Seite:

6.1.3. Charakterisierung der gebildeten Hybride mit Hilfe ihres $T_{m(e)}$ 97

6.2. $T_{m(e)}$-Werte von DNA/DNA-Hybriden coryneformer Bakterien mit Mureinen der Gruppe B 1oo

6.2.1. Verlauf der Schmelzkurven von Hybriden mit unterschiedlicher Sequenzhomologie 1oo

6.2.2. Überprüfung der Homologiebefunde mit Hilfe des $T_{m(e)}$ der DNA/DNA-Hybride 1o1

7. DNA/rRNA-Hybridisierungen 1o5

7.1. Isolierung der ^{3}H-rRNA 1o5

7.1.1. Zeitpunkt der Zellernte 1o5

7.1.2. Verlauf der ^{3}H-rRNA-Reinigung 1o6

7.2. Theoretische Überlegungen zur DNA/rRNA-Hybridisierung 1o7

7.2.1. Vergleich von 16S- und 23S-rRNA 1o7

7.2.2. Beeinflussung des Reaktionsablaufs durch verschiedene Parameter 1o8

7.2.3. Nachbehandlung der filtergebundenen DNA/rRNA-Hybride 1o8

7.2.4. Auswertung der DNA/rRNA-Hybridisierungen 11o

7.2.4.1. Prozentuale Bindung 11o

7.2.4.2. $T_{m(e)}$ 111

7.2.4.3. Ähnlichkeitsdiagramme 111

7.3. DNA/rRNA-Hybridisierungen bei coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe B 113

7.3.1. Nachinkubation der DNA/rRNA-Hybride 113

7.3.2. prozentuale Bindung 113

7.3.3. $T_{m(e)}$-Werte 114

7.3.4. Ähnlichkeitsdiagramme 117

D. Diskussion 123

E. Zusammenfassung 14o

F. Literaturverzeichnis 142

Seite:

Abkürzungen

A	Adenin
A.	Arthrobacter
Ag.	Agromyces
Ala	Alanin
B.	Brevibacterium
C	Cytosin
C.	Corynebacterium
Ce.	Cellulomonas
CTAB	N-cetyl-N,N,N-trimethyl-Ammoniumbromid
DAB	Diaminobuttersäure
m-DAP	meso-Diaminopimelinsäure
dlt	Dalton
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNA_F	filtergebundene DNA
DNA_S	lösliche DNA (radioaktiv, fragmentiert)
dUMP	Desoxyuridin-Monophosphat
E.	Eubacterium
Er.	Erysipelothrix
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FA	Formamid
FdU	5-Fluoro-Desoxyuridin
G	Guanin
$Gal-NH_2$	Galactosamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HD	Hefe-Dextrose
HE	Hefeextrakt
Hsr	Homoserin
Hyg	Hydroxyglutaminsäure
K.	Kurthia
L.	Listeria
Lb.	Lactobacillus

Lys	Lysin
M.	Microbacterium
MG	Molekulargewicht
NG	Naßgewicht
O.D.	optische Dichte (bei $\lambda = 578_{nm}$)
Orn	Ornithin
PAA	Polyacrylamid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
S.	Staphylococcus
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SSC	Standard-Saline-Citrat
T	Thymidin
T_m	Schmelzpunkt doppelsträngiger Nukleinsäure (Temperatur, bei der 5o % der Extinktionszunahme, bedingt durch thermische Denaturierung der Nukleinsäure, erreicht sind)
TAM	Testmedium für A. terregens
TEMED	N,N,N' N-tetramethyl-Äthylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
ZW	Zellwand

A. EINLEITUNG

Lehmann und Neumann stellten 1896 die Gattung Corynebacterium auf, deren Vertreter sie als menschen- und tierpathogene bzw. parasitische, aerobe, grampositive, unbewegliche, nicht sporenbildende und unregelmäßig keulenförmige Stäbchen charakterisierten. In der Folgezeit wurde jedoch bei der Eingliederung neuer Organismen in diese Gattung die ursprüngliche Definition nicht immer streng eingehalten. Die daraus entstandene Heterogenität dieses Taxons führte in der 7. Auflage von "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (Breed et al., 1957) zu seiner Aufteilung in die Genera Corynebacterium Lehmann und Neumann, 1896 und Arthrobacter Conn und Dimmick, 1947, die gemeinsam mit den Gattungen Microbacterium Orla-Jensen, 1919, Cellulomonas Bergey et al., 1923, emend. Clark, 1952, Listeria Pirie, 1940 und Erysipelothrix Rosenbach, 1909 zur Familie Corynebacteriaceae Lehmann und Neumann, 1907 zusammengefaßt wurden. Neuere Erkenntnisse stellten diese Einteilung jedoch wieder in Frage, so daß in der 8. - und bisher neuesten - Auflage von "Bergey's Manual" (Buchanan und Gibbons, 1974) die "Gruppe coryneformer Bakterien", deren taxonomischer Rang nicht mehr definiert wird, folgende Gattungen umfaßt:

I. Corynebacterium Lehmann und Neumann, 1896
Aufgrund der pathogenen Eigenschaften seiner Vertreter wurde dieses Genus in drei Sektionen unterteilt:
1. Menschen- und tierpathogene sowie -parasitäre Organismen
2. Pflanzenpathogene Organismen
3. Nichtpathogene Organismen

II. Arthrobacter Conn und Dimmick, 1947
In den Verwandtschaftsbereich dieser Gattung werden, incertae sedis, die Genera
A. Brevibacterium Breed, 1953 und
B. Microbacterium Orla-Jensen, 1919 gestellt.

III. Cellulomonas Bergey, 1923, emend. Clark, 1952

IV. Kurthia Trevisan, 1885 - "versuchsweise".

Die Zuordnung bestimmter Spezies zum Genus Corynebacterium durch Rogosa et al. (1974) erfolgt immer noch hauptsächlich nach morphologischen Gesichtspunkten: stark bis schwach gekrümmte Stäbchen, oft mit keulenförmigen Anschwellungen; palisadenförmige Anordnung der Zellen. Von den nichtpathogenen Corynebakterien sind in den meisten Fällen keine weiteren Eigenschaften bekannt. Während die Corynebakterien der Sektion 1 im Allgemeinen nicht beweglich sind, aerob oder fakultativ anaerob und von 52 bis 68 Mol % G+C der DNA aufweisen, finden sich bei den pflanzenpathogenen Corynebakterien einige bewegliche Arten, ihr Energiestoffwechsel verläuft rein respiratorisch und es wurden G+C-Gehalte der DNA zwischen 65 und 75 % bestimmt. Außerdem zeichnen sich die menschen- und tierpathogenen bzw. -parasitischen Corynebakterien durch den Besitz von m-DAP und Arabinogalactan in der Zellwand sowie eine besondere Lipidkomponente, die Mycolsäuren, aus.

Die Kombination dieser Merkmale tritt außerhalb der Gruppe coryneformer Organismen noch bei den Gattungen Mycobacterium und Nocardia auf. Diese beiden Genera werden dementsprechend gemeinsam mit Corynebacterium zur "CMN-Gruppe" zusammengefaßt.

Die Vertreter der Gattung Arthrobacter zeichnen sich durch ihren ausgeprägten Formwechsel aus: während des Wachstums in statischer Kultur findet ein Übergang von Stäbchen coryneformer Morphologie zu coccoiden Formen statt. In den Zellwänden der Organismen wird kein m-DAP und keine Arabinose gefunden. Alle Vertreter sind strikt aerob. Für den G+C-Gehalt der DNA wird ein Bereich von 6o bis 72 % angegeben.

Bei der ursprünglichen Beschreibung des Genus Brevibacterium wurde die coryneforme Morphologie der betreffenden Organismen nicht erkannt. Neuere Untersuchungen morphologischer, physiologischer und biochemischer Eigenschaften - insbesondere der Murein-Primärstruktur - einzelner Brevibakterien zeigen eine große Ähnlichkeit mit den entsprechenden Merkmalen innerhalb der Gattungen Arthrobacter bzw. Corynebacterium. Da bei Herausgabe der 8. Auflage von Bergey's Manual jedoch von den meisten der aufgeführten Brevibakterien nur die Ökologie bekannt war, wurde das Genus "incertae sedis" aufrechterhalten.

Die Gattung Microbacterium umfaßt vier Arten, wobei für M. flavum der Transfer in die Gattung Corynebacterium vorgeschlagen wird und M. thermosphactum bereits aufgrund des G+C-Gehalts seiner DNA (36 % gegenüber 69 % des Typstamms M. lacticum) ebenfalls aus diesem Genus ausgeschlossen werden sollte. M. lacticum und M. liquefaciens unterscheiden sich von Corynebacterium und Arthrobacter durch erhöhte Hitzeresistenz. Die fakultativ anaeroben Organismen erzeugen beim anaeroben Wachstum hauptsächlich Milchsäure.

Als charakteristische Eigenschaft der als Cellulomonas klassifizierten Organismen wird die Fähigkeit des Celluloseabbaus hervorgehoben, sowie der Befund, daß die Zellwände niemals m-DAP und Arabinose enthalten. Allerdings wird die Möglichkeit, daß Stämme auftreten, welche Cellulose nicht angreifen können, in der Definition des Genus nicht ausgeschlossen. Die Energiegewinnung verläuft hauptsächlich respiratorisch, meist ist jedoch auch Wachstum unter anaeroben Bedingungen möglich. Der G+C-Gehalt der DNA bewegt sich zwischen 72 und 73 %.

Die Vertreter der Gattung Kurthia sind strikt aerob und erscheinen als regelmäßige, in Ketten angeordnete Stäbchen, die in älteren Kulturen zu coccoiden Zellen fragmentiert werden. Da dieses Genus in der 7. Auflage von "Bergey's Manual" zusammen mit dem Genus Brevibacterium die Familie Brevibacteriaceae bildete, wurde es in der 8. Auflage "versuchsweise" mit in die "Gruppe coryneformer Bakterien" aufgenommen.

Die Aufzählung der Merkmale, die in der neuesten Auflage von "Bergey's Manual" zur Differenzierung der coryneformen Bakterien angewendet wurden, zeigt, daß die taxonomische Charakterisierung dieser Organismen noch nicht befriedigend durchgeführt werden konnte. Schwerpunktmäßig wurden morphologische Gesichtspunkte berücksichtigt, deren taxonomische Aussagekraft immer stärker angezweifelt wird (Stackebrandt und Woese,1979; Stackebrandt et al., 198oa). In den letzten Jahren konnten jedoch Untersuchungen biochemischer Merkmale entscheidend zur Klärung der taxonomischen Verhältnisse bei den coryneformen Bakterien beitragen. Ein wertvolles Charakteristikum auf dieser Basis ist die Primärstruktur des Mureins (Fiedler et al., 197o). Sie erfüllt alle Forderungen, die an ein "brauchbares taxonomisches Merkmal" gestellt werden: Ubiquitäre Verbreitung in der Gruppe, die

klassifiziert werden soll; Zusammenwirken zahlreicher Gene bei der Ausbildung des Phänotyps, um eine gewisse Stabilität zu gewährleisten und eine konvergente Entwicklung identischer Variationen unwahrscheinlich zu machen; und eine Variabilität der möglichen Strukturen, die groß genug ist, um eine Differenzierung der betroffenen Organismen zu erlauben (Schleifer und Kandler, 1972).

Schleifer und Kandler (1972) teilten die aufgeklärten Murein-Primärstrukturen in zwei Gruppen ein (Abb.1).

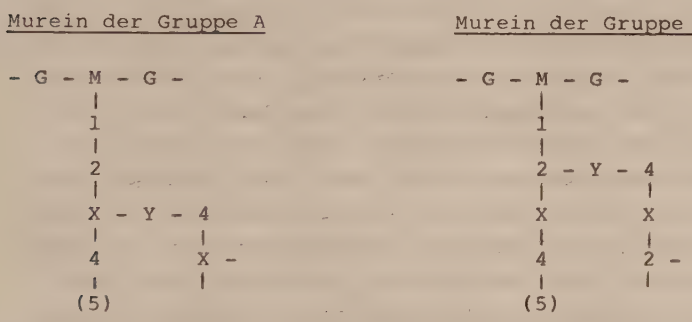


Abb.1:

Schematische Darstellung der Mureintypen der Gruppen A und B

G = N-Ac-Glucosamin; M = N-Ac-Muraminsäure; X = Aminosäure in Position 3 der Peptiduntereinheit; Y = Interpeptidbrücke.

Die Positionen 2 und 4 sind stets von D-Glu bzw. D-Ala besetzt, in manchen Fällen bleibt das D-Ala in Position 5 der Peptiduntereinheit als Biosyntheserelikt erhalten. Position 1 wird bei den Mureinen der Gruppe A von L-Ala eingenommen, in den Mureinen der Gruppe B findet man statt dessen Gly oder L-Ser. Die Aminosäure in Position 3 und die Zusammensetzung der Interpeptidbrücke variieren bei den verschiedenen Mureintypen.

Die Unterscheidung in die Hauptgruppen A und B ist abhängig vom Ausgangspunkt der Quervernetzung zweier benachbarter Peptiduntereinheiten. Bei den Mureinen der Gruppe A erfolgt diese zwischen der ω-Aminogruppe der Diaminosäure in Positon 3 und der Carboxylgruppe des D-Ala in Position 4. In den Mureinen der Gruppe B verläuft die Quervernetzung von der α-Carboxylgruppe der D-Glu in Position 2 zur Carboxylgruppe des D-Ala in Position 4.

Für die Ausbildung einer lückenlosen Kette von Peptidbindungen ist im letzteren Fall die Zwischenschaltung einer Interpeptidbrücke notwendig, welche eine Diaminosäure enthält. Diese kann in D- oder L-Konfiguration vorliegen. Die Diaminosäure in Position 3 der Peptiduntereinheit kann durch eine Mono-Aminosäure ersetzt sein. Bei den Mureinen der Gruppe A ist eine direkte Quervernetzung zweier Peptiduntereinheiten möglich. Es kommen jedoch auch hier Interpeptidbrücken vor, die entweder aus einer vollständigen Peptiduntereinheit bestehen oder aus anderen (Mono-)Aminosäuren unterschiedlicher Natur und Anzahl. Vorhandensein oder Abwesenheit, Zusammensetzung und Überlegungen zur Biosynthese der Interpeptidbrücke bilden die Kriterien zur Aufstellung von Murein-Untergruppen: A 1-4 und B 1-2; im Klassifikationssystem von Schleifer und Kandler (1972). Die Aminosäure X in Position 3 der Peptiduntereinheit bestimmt die jeweilige Variation: α, ß, γ, (δ); der Untergruppe.

Die coryneformen Organismen zeigen die größte Variationsbreite von Mureintypen unter allen Bakterienfamilien: 3o unterschiedliche Murein-Primärstrukturen wurden bisher bei den coryneformen Bakterien identifiziert, fast die Hälfte davon wird ausschließlich innerhalb dieser Bakteriengruppe gefunden (Fiedler et al., 197o). Tabelle 1 liefert einen Überblick über das Auftreten der verschiedenen Mureintypen bei Gattungen coryneformer Bakterien.

Tab.1: Mureintypen coryneformer Bakterien mit Angabe der Gattungen bei denen sie gefunden wurden (nach Schleifer und Kandler, 1972).

A = Arthrobacter, B = Brevibacterium, C = Corynebacterium, Ce = Cellulomonas, Er = Erysipelothrix, K = Kurthia, L = Listeria, M = Microbacterium, Mc = Micrococcus.

Variation	Mureintyp[1]	gefunden in den Gattungen:
A 1 γ	m-DAP	A, B, C, L, M, "Mc"
A 3 α	L-Lys - Gly	A, B
	L-Lys - L-Ala	A
	L-Lys - L-Ala$_2$	A
	L-Lys - L-Ala$_3$	A
	L-Lys - L-Ala$_4$	A
	L-Lys - L-Thr - L-Ala	A
	L-Lys - L-Thr - L-Ala$_2$	A
	L-Lys - L-Thr - L-Ala$_3$	A, C
	L-Lys - L-Ala - L-Thr - L-Ala	A, B, C
	L-Lys - L-Ser - L-Thr - L-Ala	A, B, C
	L-Lys - L-Ser - L-Ala$_{2-3}$	A
A 3 γ	L,L-DAP - Gly	A
	L,L-DAP - Gly$_3$	A
A 4 α	L-Lys - D-Asp	B, K
	L-Lys - D-Glu	B
	L-Lys - Ala - Glu	A, B
	L-Lys - D-Ser - D-Asp	B, C
A 4 β	L-Orn - D-Asp	Ce
	L-Orn - D-Glu	Ce
A 4 γ	m-DAP - D-Asp$_2$	A
	m-DAP - D-Glu$_2$	A
B 1 α	[L-Lys] D-Glu - Gly - L-Lys	C, M
B 1 β	[L-Hsr] D-Glu - Gly$_2$ - L-Lys	B
	[L-Hsr] D-Glu - Gly - L-DAB	C 2)
B 1 γ	[L-Glu] D-Glu - Gly$_2$ - L-Lys	A
B 1 δ	[L-Ala] D-Glu - Gly - L-Lys	Er
B 2 β	[L-Hsr] D-Glu - D-Orn	B, C
	[L-Hsr] D-Glu - Gly - D-Orn	A, B, C, M
B 2 γ	[L-DAB] D-Glu - D-DAB	B, C

1) Mureine der Gruppe A: Die erste der aufgeführten Aminosäuren befindet sich in Position 3 der Peptiduntereinheit, darauf folgen die Aminosäuren der Interpeptidbrücke.
Mureine der Gruppe B: In eckigen Klammern ist die Aminosäure in Position 3 der Peptiduntereinheit angegeben, danach die Aminosäure in Position 2 mit der anhängenden Interpeptidbrücke

2) Fiedler und Kandler, 1973.

Offensichtlich entspricht die Verteilung der verschiedenen Mureintypen nicht der taxonomischen Gruppierung der coryneformen Bakterien, wenn auch einige Tendenzen in dieser Richtung zu erkennen sind. Es wurden jedoch mehrfach Neuklassifizierungen coryneformer Organismen vorgeschlagen, denen neben anderen biochemischen und physiologischen Merkmalen die Primärstruktur oder auch nur die qualitative Aminosäurezusammensetzung des Mureins zugrunde liegt (Fiedler et al., 197o; Yamada und Komagata, 1972; Keddie und Cure, 1977, 1978). DNA-Homologieuntersuchungen innerhalb der Gattungen Arthrobacter (Stackebrandt und Fiedler, 1979) und Cellulomonas (Stackebrandt und Kandler, 1979) ergaben, daß Arten mit identischem Mureintyp meist hoch verwandt sind (mindestens 4o % DNA-Homologie) während Vertreter mit unterschiedlichen Murein-Primärstrukturen grundsätzlich geringere Ähnlichkeit aufwiesen.

Die taxonomische Bedeutung des Mureintyps bei den coryneformen Bakterien wurde hiermit durch genetische Untersuchungen für zwei Beispiele mit Mureinen der Gruppe A folgendermaßen aufgezeigt: Stämme mit unterschiedlicher Mureinzusammensetzung können niemals derselben (oder sehr nahe verwandten) Spezies angehören. - Andererseits ist die Ausbildung desselben Mureintyps jedoch kein Hinweis auf ein hohes Verwandtschaftsniveau. So tritt etwa der Mureintyp L-Lys - Gly bei Bifidobakterien auf (Kandler, 197o), daneben bei einem als Arthrobacter klassifizierten Organismus und B. acetylicum (Fiedler et al., 197o). Das m-DAP - direkt-quervernetzte Murein der Gruppe A kommt bei Clostridien, Bazillen, Laktobazillen, Propionibakterien, Corynebakterien und Actinomyceten vor, aber ebenso bei allen gramnegativen Bakterien (cf. Schleifer und Kandler, 1972).

Mureine der Gruppe B fanden sich bisher fast ausschließlich bei coryneformen Bakterien: Als erster "B-Typ-Organismus" wurde C. poinsettiae von Perkins (1967) identifiziert. Darauf folgten C. insidiosum und C. sepedonicum (Perkins, 1968). M. lacticum (Schleifer et al., 1968) und M. liquefaciens (Schleifer, 197o). Aus den umfassenden Untersuchungen von Fiedler (1971) ging hervor, daß der ungewöhnliche Mureintyp B darüberhinaus noch bei einer größeren Anzahl coryneformer Bakterien vorkommt. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Stämme der Gattungen Brevibacterium und Corynebacterium, von denen eine Reihe als pflanzenpathogen bekannt sind, sowie um zwei Arten der Gattung Microbacterium und A. terregens als einzigen Arthrobacter.

Aber auch außerhalb der Gruppe coryneformer Bakterien fanden sich vereinzelt Organismen mit Mureinen der Gruppe B :

Butyribacterium rettgeri (Guinand et al., 1969), das als Synonym von E. limosum zu betrachten ist (Moore und Cato, 1965) und das der Familie Propionibacteriaceae zugeordnet wurde (Holdeman and Moore, 1974),

Erysipelothrix rhusiopathiae (Fiedler und Kandler, unveröffentlicht, cf.Schleifer und Kandler, 1972), der in der 7. Auflage von Bergey's Manual der Familie Corynebacteriaceae zugeordnet war, in der 8. Auflage jedoch als "genus of uncertain affiliation" dem Verwandtschaftsbereich der Laktobazillen angegliedert ist,

Agromyces ramosus (Fiedler und Kandler, 1973), aufgrund morphologischer, biochemischer und physiologischer Charakteristika als intermediäre Form zwischen Actinomyces und Nocardia angesehen (Gledhill und Casida, 1969),

Acetobacterium woodii (Kandler und Schoberth,1979), das bei seiner Erstbeschreibung (Balch et al., 1977b) versuchsweise in die Familie Propionibacteriaceae gestellt wurde,

und Clostridium barkeri (cf. Tanner et al., 1981).

Bei Betrachtung dieser Daten erhebt sich die Frage nach der taxonomischen Relevanz des Merkmals "Murein der Gruppe B":

Kennzeichnet diese ungewöhnliche Mureinstruktur eine einzige phylogenetische Entwicklungslinie, d.h. sind alle betreffenden Organismen verwandt ? Ist demzufolge die Klassifizierung der oben aufgeführten Arten außerhalb der Gruppe coryneformer Bakterien unkorrekt ?

Oder entstanden Mureine der Gruppe B mehrmals unabhängig voneinander während der Evolution der Prokaryonten ? Auf welchem taxonomischen Niveau sind Organismen mit B-Typ-Murein untereinander und mit Vertretern des Mureintyps A verwandt ? Repräsentieren sie verschiedene Ordnungen, Familien, Gattungen oder Arten ?

In der Literatur gibt es nur wenig Hinweise, die zur Klärung dieser Fragen beitragen könnten:

Am besten charakterisiert sind die pflanzenpathogenen Vertreter unter den B-Typ-Coryneformen. Die Mechanismen, die zur Ausbildung der Krankheitssymptome an den befallenen Pflanzen führen, lassen bei ihnen in gewisser Weise einen Zusammenhang mit Verwandtschaftsverhältnissen erkennen: C.fascians, der aufgrund zahlreicher biochemischer Charakteristika (Robinson, 1966; Fiedler, 1971; Yamada und Komagata, 1972; Starr et al., 1975; Keddie und Cure, 1977; Collins et al., 1979; Stackebrandt, 198o) der CMN-Gruppe zugeordnet werden muß, unterscheidet sich durch das von ihm erzeugte Krankheitsbild und dessen Auslösemechanismus grundlegend von den pflanzenpathogenen B-Typ-Coryneformen (Lelliott, 1966; Starr, 1959; Strobel, 197o; Rogosa et al., 1974). Allerdings werden die durch die B-Typ-Organismen hervorgerufenen Symptome auch von pflanzenpathogenen Bakterien aus anderen Verwandtschaftsgruppen erzeugt (Rogosa et al., 1974; Lelliott, 1974) und können somit nicht als spezifisches taxonomisches Merkmal gewertet werden.

Charakteristische Stoffwechselwege, die Aussagen zur Taxonomie der Gruppe ermöglichen könnten, sind nicht bekannt. Bei einigen ausgewählten Vertretern wurden zwar Aspekte des Glucose-Katabolismus untersucht (Zajic et al., 1956; Katznelson, 1958; Zagallo und Wang, 1967), die dabei erzielten Ergebnisse sind jedoch teilweise widersprüchlich und erlauben keine Aussagen zur taxonomischen Stellung der Organismen mit Mureinen der Gruppe B.

Stoffwechselvorgänge, deren Produkte mit einfachen Methoden nachgewiesen werden, bilden in der Hauptsache die Basis numerisch-taxonomischer Untersuchungen. Dabei bleibt jedoch die unterschiedliche Komplexität der zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen und ihrer genetischen Determination unberücksichtigt. In den einschlägigen Arbeiten (Da Silva und Holt, 1965; Harrington, 1966; Davis und Newton, 1969; Bousfield, 1972; Jones, 1975; Dye und Kemp, 1977; Seiler et al., 1977) werden meist nur pflanzenpathogene Vertreter der Mureingruppe B sowie Microbakterien berücksichtigt. Es liegen Hinweise auf deren Zusammengehörigkeit, Verwandtschaft zu den Genera Arthrobacter und Cellulomonas und geringe Ähnlichkeit mit dem Typstamm C. diphtheriae vor, aber ebenso auch dem widersprechende Daten, die die einzelnen B-Typ-Organismen jeweils gemeinsam mit Vertretern mit Mureinen der Gruppe A in unterschiedliche Cluster einordnen.

Bei verschiedenen B-Typ-Coryneformen wurden Untersuchungen über Nährstoffansprüche durchgeführt (Starr, 1949; Lachance, 196o, 1962; Keddie et al., 1966). Darin wurde bei einigen Pflanzenpathogenen ein Bedürfnis für bestimmte Vitamine und Aminosäuren, sowie Purine und Pyrimidine nachgewiesen. Das Wachstum des aus dem Boden isolierten A. terregens - dem einzigen Vertreter der Mureingruppe B, der als Arthrobacter klassifiziert ist - muß mit einem Eisen-chelierenden Wuchsstoff supplementiert werden (Lochhead, 1958; Burnham und Neilands, 1961; Morrison et al., 1965). Derartige Auxotrophien

können sich im Verlauf der Evolution leicht bei solchen Organismen entwickeln, deren natürlicher Lebensraum die entsprechenden Wuchsstoffe zur Verfügung stellt. Die Veränderungen des Genoms, die ihnen zugrunde liegen, können theoretisch aus der Mutation eines einzigen Basenpaares der DNA bestehen und sind deshalb, wenn - wie im vorliegenden Fall - ihr biochemischer Hintergrund nicht bekannt ist, als taxonomische Merkmale wertlos. Auf eine Sonderstellung von A. terregens oder der pflanzenpathogenen Organismen innerhalb der B-Typ-Coryneformen kann auf dieser Basis nicht geschlossen werden.

Neben der Betrachtung bestimmter Stoffwechseleigenschaften und der Primärstruktur des Mureins wird auch die Analyse von akzessorischen Komponenten der Zellhülle zu taxonomischen Betrachtungen herangezogen. Die hierfür geeigneten indirekten Methoden der immunologischen, Phagen- und Bacteriocintypisierung, mit denen die dreidimensionalen Strukturen bestimmter Molekülspezies und die Anordnung von elektrischen Ladungen auf ihrer Oberfläche verglichen werden können, wurden zum Teil auch auf B-Typ-Coryneforme angewendet. Immunologische Untersuchungen von tryptisch gereinigten Zellwänden (Cummins, 1962) und Zellwand-Polysacchariden (Lazar, 1968)führten dabei - teils aufgrund methodischer Schwierigkeiten, teils wegen ungeeigneter Auswahl des Vergleichsmaterials - nicht zu dem gewünschten Erfolg. Phagentypisierungen, die mit B-Typ-Organismen durchgeführt wurden (Klement und Lovas, 1959; Echandi und Sun, 1973), erwiesen sich zwar als geeignet für die Identifizierung von Stämmen einer Art, jedoch nicht für Vergleiche auf höheren taxonomischen Niveaus. Bei einer Bacteriocintypisierung pflanzenpathogener Corynebakterien (Gross und Vidaver, 1979) zeigten Spezies mit derselben Murein-Primärstruktur stets sehr ähnliche Reaktionsmuster. Doch auch diese Studie ist für taxonomische Erwägungen nur von begrenzter Bedeutung, da sich lediglich 85 % der untersuchten Stämme erfassen ließen.

Im Gegensatz zu diesen indirekten Untersuchungen der räumlichen Struktur liefert die chemische Analyse Informationen über die Primärstruktur eines Makromoleküls oder zumindest dessen qualitative Zusammensetzung aus monomeren Bauteilen. Die taxonomische Bedeutung der Murein-Primärstruktur wurde bereits erörtert. Innerhalb der CMN-Gruppe erwiesen sich aus Arabinose und Galactose aufgebaute Zellwand-Polysaccharide (Arabinogalactan) als taxonomisch relevant (Cummins, 1962). Die neutralen Zuckerkomponenten, die bisher in den Zellwänden von B-Typ-Coryneformen nachgewiesen wurden (Diaz-Mauriño und Perkins, 1974; Keddie und Cure, 1978; Köster-Meißner, 1979; Fiedler, pers.Mitteilung) können jedoch nicht für eine Gruppenabgrenzung gegen A-Typ-Organismen verwendet werden. Allerdings wurden in Zellwand-Präparationen einiger B-Typ-Coryneformer Uronsäuren gefunden, die einen Hinweis auf das Vorkommen von Teichuronsäuren geben (Diaz-Mauriño und Perkins, 1974; Köster-Meißner, 1979). In den Zellwänden von Organismen mit Mureinen der Gruppe A sind bisher keine Uronsäuren nachgewiesen worden. Solange jedoch kein besser ausgearbeitetes Vergleichsmaterial vorliegt und nicht geklärt ist, wie die identifizierten Komponenten in die Gesamtstruktur der Zellwand eingebaut sind, ist die taxonomische Aussagekraft der akzessorischen Zellwandpolysaccharide noch fraglich.

Hinweise auf engere Verwandtschaft der B-Typ-Coryneformen untereinander liefert das Absorptionsspektrum der Cytochrome (Faller, 198o). Allerdings wurden diesbezüglich nur sechs Vertreter mit Mureinen der Gruppe B untersucht, wodurch die Allgemeingültigkeit dieses Befundes noch nicht zufriedenstellend bewiesen ist.

Die in der Literatur vorliegenden Untersuchungen über die Membranlipide coryneformer Bakterien beziehen dagegen eine relevante Anzahl von B-Typ-Organismen mit ein (Yamada et al.,

1976; Collins et al., 1979, 198o; Collins und Jones, 198o). Spezifische Lipidkomponenten der B-Typ-Coryneformen sind anteiso-C_{15}- und -C_{17}- sowie iso-C_{16}-Fettsäuren. Zum Vergleich sei erwähnt, daß man in der Gattung Cellulomonas hauptsächlich unverzweigte und anteiso-C_{15}-Fettsäuren findet, die "echten Corynebakterien" besitzen vorwiegend unverzweigte und einfach-ungesättigte Fettsäuren. Auch auf der Basis der Menachinonzusammensetzung ist eine Differenzierung der coryneformen Bakterien zu erkennen: Die B-Typ-Coryneformen weisen ausschließlich unhydrierte Menachione auf; bei allen anderen coryneformen Bakterien sind stets - zumindest teilweise - eine oder zwei Doppelbindungen in den Polyprenylresten bestimmter Menachinonspezies hydriert.

Yamada und Komagata (1972) konzipierten ein Klassifizierungsschema für die Gruppe coryneformer Bakterien, welches auf der "Haupt-Aminosäure der Zellwand", dem G+C-Gehalt der DNA, der Art der Zellteilung und physiologischen und biochemischen Charakteristika beruht. Die in dieser Studie vorgeschlagene neue Gattung Curtobacterium umfaßt B-Typ-Organismen mit ornithinhaltigem Murein. Darüberhinaus finden sich Vertreter mit B-Typ-Murein noch in zwei weiteren Gruppen dieses Klassifizierungsschemas. Eine dieser beiden Gruppen enthält nur solche Organismen, die aufgrund gewisser Unstimmigkeiten nicht in die anderen Cluster - denen jeweils der Rang von Gattungen zugeschrieben wird - eingeordnet werden konnten. Somit konnte auch durch diese Arbeit die Frage nach der Taxonomie der B-Typ-Coryneformen nicht befriedigend geklärt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe B bisher nur ungenügend charakterisiert sind. Meist sind lediglich wenige Vertreter bezüglich eines Merkmals untersucht, so daß keine allgemeingültigen Aussagen zu ihrer Taxonomie gemacht werden können. Neben der Murein-Primärstruktur gibt lediglich die Lipidzusammensetzung einen Hinweis auf ihre Verwandtschaft.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit es es, dieses taxonomische Problem durch Untersuchungen auf genetischer Grundlage zu lösen.

Einen ersten Überblick über Verwandtschaftsverhältnisse ermöglicht dabei die Basenzusammensetzung der DNA. Im Verlauf der Evolution haben sich innerhalb der Prokaryonten G+C-Gehalte der DNA von 22 bis 75 % herausgebildet (Marmur et al., 1963a), wobei Organismen mit ca. 2o % Unterschied im G+C-Gehalt praktisch keine längeren Nukleotidsequenzen mehr gemeinsam haben können (De Ley, 1969). Eine Übereinstimmung in der Basenzusammensetzung der DNA allein ist allerdings kein Beweis für hohe genetische Ähnlichkeit. So zeigen z.B. gramnegative Organismen aus der Gattung Pseudomonas einen ähnlich hohen G+C-Gehalt der DNA wie die grampositiven Corynebakterien (cf. Kandler und Schleifer, 198o). Jedoch schließen größere Unterschiede im G+C-Gehalt enge Verwandtschaftsbeziehungen mit Sicherheit aus. Deshalb ist es unbedingt gerechtfertigt, dieses grundlegende Merkmal bei taxonomischen Betrachtungen zu berücksichtigen. Coryneforme Bakterien zeigen 48 bis ca. 75 % G+C-Gehalt der DNA (Rogosa et al., 1974), wobei sich die Werte bei den menschen- und tierpathogenen Corynebakterien hauptsächlich zwischen 52 und 6o % bewegen, bei Vertetern der Gattungen Arthrobacter, Brevibacterium, Cellulomonas und vielen pflanzenpathogenen Corynebakterien dagegen zwischen 67 und 75 % (Yamada und Komagata, 197o; Rogosa et al., 1974). Da sich jedoch die als C. pyogenes und C. haemolyticum klassifizierten Organismen - bei gleicher Basenzusammensetzung der DNA - aufgrund etlicher anderer taxonomischer Merkmale stark von den übrigen tierpathogenen Corynebakterien unterscheiden, kommen Rogosa et al. (1974) zu der Ansicht: "... es hat den Anschein, daß Bestimmungen des DNA-Basenverhältnisses von begrenztem Wert in der Taxonomie coryneformer Organismen sind."

Die Basenzusammensetzung der DNA stellt eine rein quantitative Information dar und kann somit nur einen groben Umriß vom Aufbau der untersuchten Genome liefern. Wesentlich präzisere Hinweise auf die Verwandtschaft zweier Organismen erhält man durch den indirekten Vergleich der Primärstrukturen ihrer DNA, der mithilfe der DNA/DNA-Hybridisierung möglich ist. Bei den für taxonomische Untersuchungen angewendeten optimalen Reaktionsbedingungen von 25°C unter dem T_m der jeweiligen DNA-Spezies sind zur Bildung thermostabiler Heteroduplices homologe Bereiche von mindestens 2o Nukleotiden Länge notwendig (Britten und Kohne, 1968). Auf dieser Basis gibt das Ausmaß der Hybridbildung Aufschluß über den Grad der Sequenzhomologie zweier heterologer DNA-Stränge. Aus statistischen Berechnungen folgt, daß Heteroduplices dabei nur bis zu 2o bis 25 % Unterschied in der Basensequenz gebildet werden (De Ley und Kersters, 1975). Dieser Bereich wird offensichtlich bereits innerhalb einer Gattung überschritten, da Brenner (1973) am Beispiel der Enterobacteriaceae feststellte, daß Vertreter desselben Genus mithilfe der DNA/DNA-Hybridisierung nicht mehr als verwandt erkannt werden konnten (sie zeigten - bei Hybridisierungsbedingungen von 25 bis 3o°C unter T_m - weniger als 15 % Homologie).

Aussagen auf höherem taxonomischen Niveau (im Bereich von Gattungen und Familien) sind jedoch über die DNA/rRNA-Hybridisierung möglich. Dabei werden Heteroduplices zwischen ribosomaler RNA und rRNA-Genen verschiedener Organismen gebildet. Die rDNA hat sich nämlich - aufgrund ihrer essentiellen Bedeutung bei der Proteinbiosynthese - im Verlauf der Evolution wesentlich konservativer verhalten als der Rest des Genoms. Dies drückt sich bereits in der Basenzusammensetzung aus. Während der G+C-Gehalt der DNA verschiedener Bakterien von 22 bis 75 % variiert, bewegt er sich bei der rRNA (mit wenigen Ausnahmen) nur mit geringfügiger Schwankungsbreite um 53 % (Woese, 1961; Takahashi et al., 1967; Pace, 1973; De Ley und De Smedt, 1975). Mithilfe von DNA/rRNA-

Hybridisierungen zwischen eng bis sehr entfernt verwandten Organismen (Doi und Igarashi, 1965; Takahashi et al., 1967; Moore und McCarthy, 1967; Bendich und McCarthy, 197o) wurde die Konservativität der rRNA immer wieder bestätigt. Die Totalsequenzierung der 16S-rRNA zweier phylogenetisch äußerst weit voneinander entfernter "Organismen" nämlich E. coli (Carbon et al., 1978; Brosius et al., 1978) und Chloroplasten aus Mais (Schwarz und Kössel, 198o), veranschaulicht die Konservativität der rRNA am deutlichsten: zwischen den Primärstrukturen der beiden Molekülspezies wurden 74 % Übereinstimmung festgestellt.

DNA/rRNA-Hybridisierungen zu taxonomischen Zwecken wurden bisher nur innerhalb weniger Bakteriengruppen durchgeführt. Einschlägige Arbeiten liegen vor über Enterobakterien und Myxobakterien (Moore und McCarthy, 1967), über Organismen aus den Gattungen Moraxella (Johnson et al., 197o), Desulfovibrio (Pace und Campbell, 1971), Pseudomonas (Palleroni et al., 1973) Clostridium (Johnson und Francis, 1975), Agrobacterium (De Smedt und De Ley, 1977), Chromobacterium und Janthinobacterium (De Ley et al., 1978), Acetobacter und Gluconobacter (Gillis und De Ley, 198o) und über freilebende Stickstoff-fixierende Bakterien (De Smedt et al., 198o), sowie über Vertreter der Gattungen Staphylococcus und Peptococcus (Meyer, 1979; Kilpper, 198o) und Rhodococcus und verwandte Taxa (Mordarski et al., 198o).

Erst im Verlauf dieser Untersuchungen wurden die phylogenetischen Zusammenhänge innerhalb der Actinomyceten mithilfe der 16S-rRNA-Partialsequenzierung aufgeklärt (Stackebrandt et al., 198ob; Stackebrandt, 198o). Da bei dieser Methode - im Gegensatz zur DNA/rRNA-Hybridisierung - auch kürzere Oligonukleotide erfaßt werden, die gemeinsam in der rRNA verschiedener Organismen auftreten (bis zu einer minimalen Länge von sechs Nukleotiden) sind Aussagen auf allen taxonomischen Niveaus möglich.

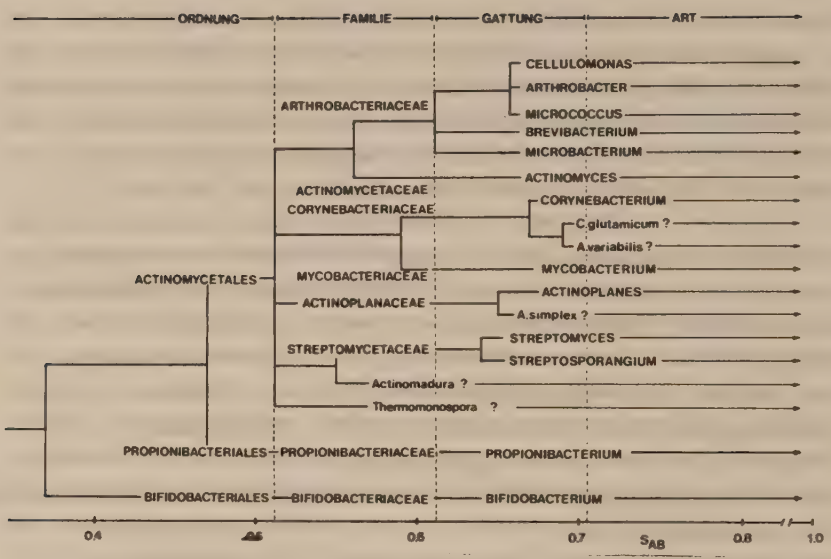


Abb.2:

Neue Klassifizierung der Actinomyceten und ihrer Verwandten, abgeleitet von den vergleichenden Untersuchungen der ribosomalen 16S-RNA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr.E.Stackebrandt).

Wie Abb.2 zeigt, wurde die Ordnung der Actinomycetales in vier "RNA-Gruppen" gegliedert, denen sechs Familien zugeordnet sind:

1. Arthrobacteriaceae und Actinomycetaceae, 2. Corynebacteriaceae und Mycobacteriaceae (CMN-Gruppe), 3. Actinoplanaceae und 4. Streptomycetaceae. Dabei gehören die drei untersuchten B-Typ-Coryneformen C. betae, C. mediolanum und M. lacticum (Gattung Microbacterium in Abb. 2) den Arthrobacteriaceae an. Die Ordnung Actinomycetales bildet zusammen mit den Propionibacteriales und den Bifidobacteriales den "Actinomyceten-Ast" des 16S-rRNA-Stammbaumes, der alle grampositiven Organismen mit hohem G+C-Gehalt der DNA umfaßt.

Mithilfe der 16S-rRNA-Katalogisierung konnte auch die taxonomische Stellung der B-Typ-Organismen Eubacterium limosum, Acetobacterium woodii und Clostridium barkeri geklärt werden (Tanner et al., 1981). Als Repräsentanten des Mureintyps [L-Orn] D-Glu - (D-Orn)D-Lys bilden sie eine gemeinsame Familie, die dem "Clostridien-Ast" des 16S-rRNA-Stammbaumes angehört. Dieser stellt die phylogenetische Entwicklung aller grampositiven Organismen mit niedrigem G+C-Gehalt der DNA dar. Erysipelothrix rhusiopathiae wurde bisher noch nicht der 16S-rRNA-Partialsequenzierung unterzogen.

Durch die 16S-rRNA-Katalogisierungen (Stackebrandt et al., 1980b) wurden die Verwandtschaftsbeziehungen dreier B-Typ-Coryneformer untereinander und zu coryneformen Organismen mit Mureinen der Gruppe A dargestellt. In den vorliegenden Nukleinsäure-Homologieuntersuchungen sollen die taxonomischen Verhältnisse von 30 definierten Sammlungsstämmen und zusätzlich von drei nicht näher identifizierten Eigenisolaten aus Molkereiabwasser präzise ermittelt werden. Dabei wurde zunächst durch die Bestimmung des G+C-Gehalts der DNA die Kohärenz der Organismen mit Mureinen der Gruppe B überprüft. Ausgehend von der Annahme, daß signifikante DNA-Homologiewerte nur zwischen Stämmen mit identischer Murein-Primärstruktur auftreten (siehe oben), wurden detailierte DNA/DNA-Hybridisierungen nur unter Vertretern desselben Mureintyps durchgeführt und durch einzelne Werte zwischen ausgewählten Stämmen

mit unterschiedlichem Mureintyp ergänzt. Nachdem auf diese Weise die Artzugehörigkeit der untersuchten Organismen geklärt worden war, konnte mithilfe von DNA/rRNA-Hybridisierungen eine fundierte Aussage zur Taxonomie der coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe B getroffen werden.

B. M A T E R I A L und M E T H O D E N

1. Organismen, Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an folgenden Organismen durchgeführt:

Stamm	Herkunft	Stamm Nr.	Isoliert aus
Agromyces ramosus	DSM	43045	Boden
Arthrobacter terregens	ATCC	13345	Boden
Brevibacterium			
albidum	CCM	2296	Oryza sativa 1)
citreum	ATCC	15828	Oryza sativa 1)
helvolum	ATCC	13715	Butter
imperiale	ATCC	8365	Eacles imperialis Dr.
insectiphilum	Bhat	146	Thyridopterix ephemeraeformis Haw.
luteum	ATCC	1583o	Oryza sativa 1)
pusillum	ATCC	19o96	Ölschlamm
saperdae	DSM	2ol69	Saperda carcharias L.
testaceum	DSM	2ol66	Oryza sativa 1)
Corynebacterium			
aquaticum	DSM	2ol46	Aqua dest.
barkeri	DSM	2ol45	Haushaltsabwasser
betae	DSM	2ol41	Beta vulgaris 2)
bovis	ATCC	13722	Kuhdung

Stamm	Herkunft	Stamm Nr.	Isoliert aus
flaccuumfaciens	DSM	2o129	Phasaeolus vulgaris 2)
flaccuumfaciens var. aurantiacum	DSM	2o135	"
insidiosum	DSM	2o157	Medicago ssp. 2)
laevaniformans	DSM	2o14o	Belebtschlamm
mediolanum	DSM	2o152	Bäckerhefe
michiganense	DSM	2o134	Lycoperson esculentum :
	ATCC	445o	" 2)
	ATCC	7429	"
nebraskense	DSM	2o4oo	Zea mays 2)
oortii	ATCC	25283	Tulipa ssp. 2)
poinsettiae	DSM	2o149	Euphorbia pulcherrima 2
sepedonicum	NCPPB	378	Solanum tuberosum 2)
coryneformer Organismus	DSM	2o143	Boden
Microbacterium			
lacticum	DSM	2o427	Milch
liquefaciens	Robinson	15	Milch
Eigenisolat	Seiler	E 36/1	Molkereiabwasser
Eigenisolat	Seiler	E 37/4	"
Eigenisolat	Seiler	S 11o	"
Eubacterium limosum	DSM	2o4o2	menschl.Faeces
Erysipelothrix rhusiopathiae	3)		Schweinerotlauf
Cellulomonas			
cellasea	DSM	2o118	
fimi	DSM	2o114	
uda	DSM	2o1o7	
Lactobacillus curvatus	DSM	2oo1o	
Staphylococcus aureus	ATCC	126oo	

Tab.2: Untersuchte Organismen, Herkunft der Stämme und Ort der Isolierung.

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
CCM: Czechoslovak Collection of Microorganisms
J.E. Purkyne Universität, Brno, Tschochoslovakei
DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen
NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, England
Bhat, J.V. Indian Institute of Science, Bangalore, Indien
Robinson, K. North of Scotland School of Agriculture, Aberdeen, Schottland
Seiler, H. Süddeutsche Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Technische Universität München, Weihenstephan.

1) Der Ort der Isolierung wurde aus dem Katalog der ATCC übernommen. Darin ist nicht zu ersehen, ob es sich um pflanzenpathogene Organismen handelt.

2) Alle anderen aus Pflanzen isolierten Spezies sind als phytopathogene Keime beschrieben.

3) aus Floßmann und Erler, 1972.

Die Stämme wurden als Schrägagarkulturen bei 4°C aufbewahrt und alle sechs bis acht Wochen auf frischen Nährboden überimpft. Vor der DNA-Isolierung wurde die Identität der Stämme durch quantitative Analyse der Aminosäuren in tryptisch gereinigten Zellwänden überprüft. Während der Anzucht der Kulturen erfolgte die Reinheitskontrolle anhand des mikroskopischen Bildes und durch Reinigungsausstriche.

2. Nährmedien und Anzuchtbedingungen

2.1. HD-Medium (= Hefe-Dextrose)

Die meisten Organismen konnten in HD-Medium kultiviert werden, das für die Versuche zur Thymidin- und Adenin-aufnahme teilweise abgeändert wurde (s.C 3.3.)

Zusammensetzung des Mediums:
1.o % Trypton (Oxoid)
o,5 % Hefeextrakt (Oxoid)
o,5 % Glucose
o,5 % NaCl
(o,9 % Agar (Oxoid)) in Aqua dest.

Vor dem Autoklavieren wurde der pH mit konz. NaOH auf 7,3 eingestellt.
Für E.limosum wurde dem Medium o,o5 % Cystein zugesetzt.

2.2. Verarmtes HD-Medium

Zur Anzucht der Zellen für die Isolierung radioaktiver RNA wurde verarmtes HD-Medium folgender Zusammensetzung verwendet:

o,5 % Trypton (Oxoid)
o,2 % Hefeextrakt (Oxoid)
o,5 % Glucose
o,2 % NaCl
in Aqua dest., pH 7,3

2.3. Halbsynthetisches Medium

Die Thymidinmarkierung der Zellen wurde in einem halbsynthetischen Medium folgender Zusammensetzung (Stackebrandt, pers. Mitteilung) vorgenommen:

Lösung A: 27 g $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$
4,5 g KH_2PO_4 in 2 l Aqua dest.

Lösung B: o,6 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$
3,o g NH_4Cl
1,5 ml Spurenelemente in 1 l Aqua dest.

Spurenelementlösung:
2,8 g H_3BO_3, 2,1 g $MnSO_4 \times 4\ H_2O$,
o,2 g $CuSO_4 \times 5\ H_2O$, o,75 g $(NH_4)_6Mo_2O_{24} \times 4\ H_2O$
o,24 g $CoCl_2$, o,25 g $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$,
1,o g Titriplex II (Merck) in 1 l Aqua bidest.

Lösung C: o,123 g NH_4-Fe-Citrat
o,25 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ in 125 ml Aqua dest.

Lösung D: 1o g Trypton (Oxoid)
1 g Hefeextrakt (Oxoid)
1 ml Multibionta-Vitaminpräparat (Merck)
in 5o ml Aqua dest.

Lösung E: 5o % Glucose in Aqua dest.

A und B werden getrennt hergestellt und sodann gemischt. Nach dem Autoklavieren der Lösung versetzt man A+B mit 1/2 Vol % C, 1/2 Vol % D und 1 Vol % E.

2.4. CASO - Bouillon

Für Agromyces ramosus erwies sich ein Medium bestehend aus

3 % CASO (Merck)
o,3 % Hefeextrakt (Oxoid)
(o,9 % Agar (Oxoid)) in Aqua dest.

als am besten geeignet. Die Zellen zur Isolierung radioaktiver DNA und RNA wurden ohne Hefeextraktzugabe angezogen.

2.5. TAM (= "terregens assay medium")

A. terregens wurde zur Isolierung hochmolekularer und radioaktiv markierter DNA in dem Medium von Reich und Hanks (1964) kultiviert, das wie folgt zusammengesetzt ist:

o,2 % Casamino Acids (Difco)
o,1 % Hefeextrakt (Oxoid)
o,1 % Glucose
o,1 % $(NH_4)_2H$-Citrat
o,2 % K_2HPO_4
o,o5 % $MgSO_4 \times 7\ H_2O$
o,oo1% $FeCl_3 \times 6\ H_2O$
(o,9 % Agar (Oxoid)) in Aqua dest., pH 7,o

Nach dem Autoklavieren wird das Medium mit einer äthanolischen Lösung von Acetylaceton (Merck) als "Terregens-Faktor" (Morrison et al., 1965) versetzt, so daß dessen Endkonzentration 1oo µg/ml beträgt. (Stammlösung : 1,o3 ml Acetylaceton/1o ml Äthanol; davon 1 µl/ml Medium)

2.6. Kultivierung der Organismen

Die Belüftung der aerob wachsenden Kulturen erfolgte durch Schütteln der Nährlösung in Erlenmeyerkolben (3oo ml Medium

in 1 l-Kolben oder 1,5 l Medium in 5 l-Kolben) oder bei Großansätzen (15 l Medium in einer Steilbrustflasche) mittels sterilisierter Preßluft durch eine Keramik-Filterkerze. E. limosum wurde in Sovirell-Flaschen mit luftdichtem Schraubverschluß angezüchtet. Hierfür wurde das Medium erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt, um eine Reoxidation durch Luftsauerstoff zu vermeiden.

Während die optimale Wachstumstemperatur für den Großteil der untersuchten Stämme 3o°C beträgt, müssen. A. terregens, B. imperiale, C. insidiosum, C. nebraskense und C. sepedonicum bei Raumtemperatur (2o-25°C) und E. limosum bei 37°C bebrütet werden.

Alle Flüssigkulturen wurden 3 %ig aus über Nacht gewachsenen Vorkulturen beimpft.

Die Zellernte erfolgte bei Flüssigkeitsvolumina bis 3 l in einer Runne-Kühlzentrifuge bei 5ooo x g und 5-1o°C, bei Massenkulturen in einer Westfalia-Durchlaufzentrifuge unter Kühlung durch Zugabe von Eis in die Kulturflüssigkeit. Das Sediment wurde mit Wasser und dann mit dem Puffer der nachfolgenden Verarbeitung gewaschen.

3. Zellwandpräparation (Schleifer und Kandler, 1967)

Über Nacht gewachsene Kulturen von 3oo ml wurden zur Inaktivierung autolytischer Enzyme 3o min im Dampftopf auf 1oo°C erhitzt; nach dem Abkühlen wurden die Zellen durch Zentrifugieren geerntet. Der Zellaufschluß erfolgte mithilfe von Glasperlen (Durchmesser: o,25-o,3o mm; Fa.Braun, Melsungen) in einer Zellmühle der Fa. Bühler, Tübingen, unter Wasserkühlung für 15 bis 3o min. Wenn bei der mikroskopischen Kontrolle des

Homogenats keine ganzen Zellen mehr zu sehen waren, wurden die Glasperlen mittels einer Schott-Gl-Fritte abgetrennt und die Zellwände aus dem Rohextrakt bei 48ooo x g und 2°C in einer Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert. Das in Wasser gewaschene Zellwandmaterial wurde in ca. 2o ml o,1 M Phosphatpuffer pH 7,8 suspendiert, mit o,5 mg Trypsin (Merck)/ml Suspension versetzt und gegen Bakterienwachstum mit Toluol überschichtet. Die "tryptische Verdauung" der Zellwände erfolgte 16 h bei 37°C. Dann wurden diese gründlich mit Aqua dest. gewaschen, um die durch die Enzymbehandlung entstandenen Peptide zu entfernen, und anschließend gefriergetrocknet (Zellwand-tryp.).

4. Qualitative und quantitative Analyse der Zellwand-Aminosäuren und -Aminozucker.

4.1. Aminosäureanalysator

Je 3,o mg der lyophilisierten Zellwände-tryp. wurden mit o,3 ml 4 N HCl versetzt, in ein Fiolaxröhrchen eingeschmolzen und 16 h bei 1oo°C hydrolysiert (Totalhydrolyse). Nach Abblasen der Salzsäure wurden Aminosäuren und -Zucker mittels eines Aminosäure-Analysators der Firma Beckman (Modell 12oc) qualitativ und quantitativ bestimmt.

4.2. Papierchromatographie

Sollte nur die Anwesenheit einer bestimmten Aminosäure qualitativ nachgewiesen werden, wurden Papierchromatogramme angelegt. Dabei wurde jeweils das Totalhydrolysat von 3 mg Zellwand punktförmig auf Papier der Fa. Schleicher und Schüll 2o43b Mgl aufgetragen. Der Nachweis der Aminoverbindungen erfolgte mit Ninhydrin-Sprühreagens [93o ml wassergesättigtes Butanol, 7o ml Eisessig, 5 g Ninhydrin (Merck)]. Die Chromatogramme wurden im Trockenschrank bei 1oo°C entwickelt.

Der Test auf Diaminopimelinsäure (DAP) wurde im Laufmittel von Rhuland (1955) durchgeführt [Methanol/Pyridin/1o N HCl/H_2O = 32o/4o/1o/7o (v/v)] unter Mitführung eines m-DAP-Standards. Die eindimensionale Auftrennung des Hydrolysats erfolgte über 18 h.

Da die Trennung von Homoserin und Muraminsäure im Aminosäureanalysator unzureichend ist, wurde die endgültige Identifizierung von Homoserin papierchromatographisch durchgeführt. Die Auftrennung einschlägiger Totalhydrolysate wurde dabei zweidimensional vorgenommen, wobei

1. in Faserrichtung des Papiers mit Isopropanol/Eisessig/Wasser = 75/1o/15 (v/v) und
2. in der anderen Papierrichtung mit α-Picolin/Ammoniak/Wasser = 7o/2/28 (v/v)

jeweils zweimal 24 h chromatographiert wurde.

5. Papierchromatographische Identifizierung der radioaktiven Komponenten im Medium während der Thymidinaufnahme.

Im Verlauf der Thymidinaufnahme wurde eine Zunahme der Radioaktivität im Medium festgestellt, wenn die Zellen in die spätlogarithmische Phase eintraten. Mithilfe qualitativer papierchromatographischer Untersuchungen sollte geklärt werden, ob dabei eine neue radioaktive Substanz im Medium auftaucht.

Vor dem Animpfen und während der verschiedenen Wachstumsphasen wurden Medienproben entnommen, in einer Eppendorf-Tisch-Zentrifuge 2 min abzentrifugiert, und nach Abblasen in Aqua bidest gelöst. Die Wassermenge wurde dabei so gewählt, daß in 5o µl der Lösung ca. 15o ooo cpm enthalten waren, die dann strichförmig jeweils über 2 cm Länge auf Whatman 1-Papier aufgetragen wurden. Als Referenz wurde eine entsprechende Menge unmar-

kiertes Thymidin mitgeführt. Nach 2o h Laufzeit in Äthanol, 96 %/1,o M Ammoniumacetat pH 7,5 = 7/3 (P-L biochemicals inc. 1o37 West McKinley Avenue, Millwaukee, Wisconsin, 532o4, USA - Serva) wurden die Laufstrecken nach Trocknen des Chromatogramms quer zur Laufrichtung in Streifen (2x3 cm) geschnitten und die darin enthaltene Radioaktivitätsmenge in je 5 ml Rotiszint 11 (mit PPO, POPOP, Toluol - für wasserfreie Proben; Fa. Roth, Karlsruhe) bestimmt (Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 3385). Der R_f-Wert von unmarkiertem Thymidin wurde unter der UV-Lampe ermittelt.

6. Präparation hochmolekularer DNA

Zur Isolierung hochmolekularer DNA wurden 15 1-Massenkulturen verwendet. Die Anzucht sehr langsam wachsender Stämme erfolgte in 5 1-Erlenmeyerkolben mit je 1,5 1 Medium. Die Zellen wurden gegen Ende der logarithmischen Phase bei einer $O.D._{578\ nm}$ = o,8 geerntet, was einem Naßgewicht von 15 bis 2o g entsprach.

6.1. Zellaufschluß

6.1.1. Lysozymbehandlung

Die Lyse der Zellen erfolgte in Saline - EDTA - Puffer (o,15 M NaCl, o,1 M EDTA, pH = 8,o in Aqua bidest.) - je 1o ml Puffer/g NG - durch Zugabe von o,4 mg Lysozym (Serva) pro ml Suspension. Das Gemisch wurde bei 37°C im Wasserbad inkubiert und alle 1o min auf Eintritt der Lyse getestet. Dazu wurde ein Aliquot von o,5 ml mit 5o µl SDS (25 %ig) versetzt. Starke Viskositätszunahme der Probe zeigte Lyse an. Diese war bei den meisten Stämmen nach spätestens 3o min erreicht. Dann wurde die gesamte Suspension zur Vervollständigung der Lyse auf eine SDS-Konzentration von 2 % gebracht und im Wasserbad 2o min auf 6o°C erhitzt. Anschließend wurde die NaCl-

Konzentration auf 1 M erhöht und die Suspension unter leichtem Schütteln auf Raumtemperatur abgekühlt.

6.1.2. Mechanischer Aufschluß durch Frenchpress-Passage

Alternativ zur enzymatischen Lyse konnten die Zellen auch ohne Beeinträchtigung der DNA-Qualität in der Frenchpress (American Instruments Company, Silver Spring, Maryland, USA) aufgeschlossen werden. Dazu wurde mit 1 M NaCl eine möglichst dickflüssige Zellsuspension hergestellt, mit 5o µl 25 %igem SDS und 5o µg Proteinase K (Merck) versetzt und nach einmaliger Passage der Zelle (Nr. o2233o) bei 1o5o kp/cm^2 sofort in Chloroform eingeleitet. Zur Viskositätserniedrigung wurde das Homogenat in der Weise verdünnt, daß, bezogen auf die eingesetzte Zellmenge, wiederum 1o ml Lysat/g NG vorlagen.

6.2. DNA-Reinigung nach Marmur (1961), modifiziert nach Back und Stackebrandt (1978)

Das Lysat wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt und 1o min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt, dann zur Phasentrennung 15 min bei 5ooo x g (Runne-Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde mit einer weitlumigen Pipette vorsichtig abgenommen und einer zweiten Chloroformausschüttelung unterworfen. Trübungen des - jetzt weitgehend deproteinisierten - Zellextrakts konnten durch Abzentrifugieren bei 48 ooo x g (Sorvall-Zentrifuge) beseitigt werden.

Die klare Lösung wurde mit 1/9 Volumen Natriumacetat-EDTA (3 M NaAc, o,ool M EDTA, pH 7,o in Aqua bidest.) versetzt, mit o,56 Volumen kaltem Isopropanol vorsichtig durchmischt und zur Beschleunigung der DNA-Fällung im Kühlschrank aufbewahrt. Nach 15 bis 3o min war die hochmolekulare DNA ausreichend dehydratisiert - erkennbar als zusammengeballte, weiße, fädige Struktur - um durch 15 min Zentrifugieren

(5ooo x g, Runne-Kühlzentrifuge) von der Lösung abgetrennt zu werden. Das Sediment wurde dann durch leichtes Schütteln über Nacht bei 37°C in o,1 x SSC (SSC = Standard-Saline-Citrat: o,15 M NaCl, o,o15 M Trinatrium-Citrat, pH 7,o in Aqua bidest.) gelöst - unter Zugabe einiger Tropfen Chloroform, um Bakterienwachstum zu verhindern. Eventuell verbliebene Trübungen wurden in 15 min bei 48 ooo x g abzentrifugiert und verworfen. Die klare Lösung wurde mithilfe 5 M NaCl auf eine Na^+-Konzentration von 1 M gebracht.

Der folgende Reinigungsschritt wurde von Darby et al. (197o) vorgeschlagen, um DNA, RNA und Polysaccharide zu trennen. Er wird hier in leicht modifizierter Form durchgeführt: Die Nukleinsäurelösung in 1 M NaCl wurde mithilfe einer Lösung von 4 % CTAB in 1 M NaCl auf einen Gehalt von 1 % CTAB gebracht. Durch anschließende Verdünnung der Lösung auf o,6 M NaCl mit Aqua bidest. wurden die CTAB-Salze der DNA selektiv ausgefällt und dann bei Raumtemperatur (CTAB präzipitiert in der Kälte) in einer Tischzentrifuge (Christ) abzentrifugiert.

Nach Lösen in 1 M NaCl - durch leichtes Schütteln bei 37°C - wurden über eine weitere Isopropanolfällung wieder die Na-Salze der DNA gewonnen. Deren Lösung in o,1 x SSC wurde mit 1o x SSC auf eine Konzentration von 1 x SSC eingestellt und 8 h bei 37°C mit 1o µg/ml RNase (Serva) behandelt. Diese wurde wiederum durch Inkubation mit 1o µg Proteinase K/ml DNA-Lösung (12 h, 37°C) entfernt.

Die endgültige Deproteinisierung erfolgte durch Zugabe von 1/2 Volumen Phenol, gesättigt mit 1 x SSC (Kirby et al., 1957) zur enzymbehandelten DNA-Lösung. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur von Hand 1 min vorsichtig geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Nachdem die Phenolphase mithilfe einer Pasteurpipette abgezogen worden war, wurde das denaturierte Protein nochmals abzentrifugiert. Zur Beseitigung des gelösten Phenols wurden mehrere Chloroform-ausschüttelungen und eine letzte Isopropanolfällung durchgeführt.

Abschließend wurde die in o,1 x SSC wiederaufgenommene DNA gegen 1 l lxSSC, o,o2 M EDTA, pH 7,5 pro DNA-Spezies 24 h lang dialysiert, um restliches Phenol und niedermolekulare Verunreinigungen zu entfernen.

Die dialysierte DNA-Lösung wurde im Kühlschrank über einigen Tropfen Chloroform aufbewahrt und jeweils unmittelbar vor der weiteren Verwendung (Spektrum, Bestimmung des G+C-Gehalts, Beladen der Filter) neu mit Isopropanol gefällt, in o,lxSSC gelöst und dann mit loxSSC auf eine Konzentration von lxSSC eingestellt.

7. Präparation radioaktiv markierter DNA

7.1. Anzuchtbedingungen

Wie unter C.3. näher ausgeführt, wurden die Zellen in 3oo bzw. 5o ml verschiedener Medien über Nacht angezüchtet. Die Zugabe von [2,8-^{3}H] Adenin oder [6-^{3}H] -Thymidin (New England Nuclear), erfolgte steril vor dem Animpfen der Nährlösung, jeweils 1 mCi/3oo ml oder o,7 mCi/5o ml. Die Zellen wurden geerntet, sobald keine Abnahme der Radioaktivität im Medium mehr festzustellen war. Diese wurde durch Abzentrifugieren und Zählen eines Aliquots der Kulturflüssigkeit in geeigneten Zeitabständen bestimmt.

7.2. Zellaufschluß

Der Zellaufschluß erfolgte in der Bühler-Zellmühle, wie unter B.3. beschrieben. Das Homogenat wurde durch Absaugen mit 4o ml Saline-EDTA von den Glasperlen getrennt und durch Abzentrifugieren (2o min, 48 ooo x g, 2°C, Sorvall) von den Zellwänden befreit. Diese wurden zur Reinheitskontrolle der Kultur weiterverarbeitet (B.3. und B.4.). Alternativ konnten die Zellen wie bei B.6. mit der Frenchpress aufgeschlossen werden.
Die weitere Reinigung und Aufbewahrung der Präparationen erfolgte wie im Falle der hochmolekularen DNA.

7.3. Fragmentierung

Um bei allen Präparationen reproduzierbar gleichmäßig große Molekülstücke zu erhalten, wurde die radioaktive DNA - nach Bestimmung der spezifischen Aktivität (s.B.8.5.) - durch dreimalige Passage der Frenchpress-Zelle (American Instruments Company Nr. o2233o) bei 1o5o kp/cm^2 fragmentiert (siehe auch C.5.1.2.5.).

8. Charakterisierung der DNA-Präparationen

8.1. UV-Spektrum

Als Summe der charakteristischen Absorptionsmaxima der einzelnen Nukleinbasen im UV-Bereich ergibt sich für Nukleinsäuren eine maximale Extinktion bei 26o nm. Diese kann zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung verwendet werden. Dabei entspricht $E_{26o\ nm} = 1,o$ einem DNA-Gehalt von 5o µg/ml (in 1xSSC und bei 1 cm Schichtdicke). Außerdem erlaubt das Absorptionsverhältnis 26o : 23o : 28o nm eine Beurteilung der Reinheit von DNA-Präparationen (Marmur, 1961) (s.C.4.).

Die DNA-Spektren wurden mithilfe eines Zweistrahlphotometers (Beckman) in Halbmikro-Quarzküvetten mit 1 cm Lichtweg bestimmt, wobei über einen Bereich von 32o bis 215 nm gemessen wurde. Um verläßliche Werte zu erhalten, muß man dabei die eingesetzte DNA-Menge so wählen, daß sich eine Extinktion zwischen o,2 und 1,o ergibt, d.h. 1o bis 5o µg DNA pro ml Probelösung sind zu verwenden.

8.2. Bestimmung der DNA-Konzentration mit Diphenylamin (Burton, 1968).

o,5 ml der DNA-haltigen Probe (die, wenn nötig nach geeigneter Verdünnung, nicht mehr als 75 µg DNA enthalten soll) wurden

mit o,5 ml 1 N $HClO_4$ 2o min im Wasserbad auf 7o°C erhitzt und nach Abkühlen mit 2 ml Burton-Reagens versetzt. Die Inkubation des Gemisches erfolgte im Dunklen, 18 h bei 3o°C.

Als Standardlösung zur Aufstellung der Eichkurve über einen Bereich von 6 bis 15o µg DNA wurde o,3 mg Lachsspermien-DNA (Serva)/ml 5 mM NaOH verwendet. Für den Nullwert wurde dem Ansatz Aqua bidest. anstelle der DNA-Lösung zugegeben. Die Intensität der eintretenden Farbreaktion ist der eingesetzten DNA-Menge bis etwa 75 µg DNA/Ansatz proportional. Die Extinktion der Probelösungen wurde bei 578 nm gemessen.

Zusammensetzung des Reagens:

1,5 g Diphenylamin (Merck), gelöst in
loo ml Eisessig und
1,5 ml konz. H_2SO_4

Unmittelbar vor Gebrauch werden pro 2o ml Reagens o,1 ml Acetaldehyd (1,6 %ig in Aqua bidest.) zugegeben.

Unter den sauren Reaktionsbedingungen wird dabei die Desoxyribose der DNA freigesetzt und zu 5-hydroxy-Lävulinaldehyd dehydriert. Dieser verbindet sich mit Diphenylamin zu einem blauen Farbstoffkomplex. Perchlorsäure und Acetaldehyd erhöhen die Sensitivität der Reaktion.

8.3. Bestimmung der RNA-Konzentration mit Orcinol (Dische,1955)

Zur Reinheitskontrolle der DNA-Präparationen wurde auf Anwesenheit von RNA mithilfe der Orcinol-Methode geprüft. Dazu wurde 1 ml Probe mit 2 ml Orcinol-Reagens versetzt und 15 min im Wasserbad gekocht.

Eine genau eingestellte Lösung der RNA von Lactobacillus casei Shirota (ATCC 27o92)* diente zur Aufstellung der Eichkurve im Bereich von 5 bis 5o µg RNA/Ansatz. Das Ausmaß der Farbreaktion wurde bei 66o nm (gegen einen Nullwert mit Aqua bidest. anstelle der RNA-Lösung) gemessen.

Zusammensetzung des Reagens:

Lösung A: loo mg $FeCl_3$ x 6 H_2O in
loo ml konz. HCl

Lösung B: 1,o g Orcinol (Merck) in
16,6 ml Äthanol

35 ml Lösung B werden loo ml Lösung A zugesetzt.

Aus der im Testgemisch freigesetzten Ribose der RNA entsteht Furfural, das in Anwesenheit von Fe^{3+} mit Orcinol zu einem grünen Farbstoffkomplex reagiert.

8.4. Bestimmung des Proteingehalts (Lowry, 1951)

Verunreinigungen der DNA-Präparationen durch Protein wurden mit dem Folin-Ciocalteu-Reagens überprüft. Damit wird spezifisch die phenolische Seitenkette des Tyrosins erfaßt.

Zur Durchführung des Tests wurden folgende Vorratslösungen hergestellt:

Lösung A: 2 % Na_2CO_3 in
o,1 N NaOH

Lösung B: o,5 % $CuSO_4$ x 5 H_2O in
1 %igem Na-Citrat

Lösung C wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn aus 5o Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B angesetzt.

---

* freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof.Dr.K.O. Stetter.

In Eppendorfgefäßen wurden loo µl DNA-Lösung (bzw. lxSSC für den Nullwert zur photometrischen Bestimmung) mit 1 ml Lösung C gemischt und nach lo min Inkubation bei Raumtemperatur mit loo ml Folin-Ciocalteu-Reagens (Merck), 1:2 verdünnt mit Aqua bidest., versetzt. Die Inkubation des Gemisches erfolgte 3o min im Wasserbad bei 25°C. Dann wurden die Proben abzentrifugiert und die Intensität des entstandenen blaugrünen Farbstoffs bei 578 nm bestimmt. Als Standard diente o,25 %iges Rinderserumalbumin (Sigma) in Tris/HCl pH 7,5 + o,o2 % NaN_3, von dem jeweils 25 µg (entspricht lo µl) in 3 Parallelen in den Test eingesetzt wurden.

8.5. Bestimmung der spezifischen Aktivität von ^{3}H-markierter DNA

Die spezifische Aktivität radioaktiver DNA wird in cpm/µg DNA angegeben. Nach Ermittlung der DNA-Konzentration einer Probe wurde ein Aliquot der Lösung mit Aqua bidest. auf 1 ml ergänzt und die enthaltene Radioaktivität in lo ml Rotiszint 22 (mit PPO, POPOP, Triton x loo und Toluol - für wasserhaltige Proben; Fa. Roth, Karlsruhe) im Szintillationszähler (Packard) bestimmt.

8.6. Bestimmung des Molekulargewichts fragmentierter DNA

Das Molekulargewicht der fragmentierten DNA wurde durch Polyacrylamid (6 %)-Plattengelelektrophorese bestimmt. Als Referenz diente DNA des E.coli-Phagen Ø X 174, die mit Hae III-Restriktionsendonuclease in Bruchstücke definierter Länge geschnitten worden war (New England Biolabs, Beverley, MA, USA).

8.6.1. Herstellung des Gels

Zur Herstellung des Gels wurden ein Gemisch von 4,5 ml einer 4o %igen Acrylamid Stammlösung:

174 g Acrylamid (BIORAD)
6 g Bisacrylamid (Serva) in
45o ml Aqua bidest. und

3,o ml zehnfach konzentriertem Elektrophoresepuffer:

o,4 M Tris-Acetat, pH 8.3
o,2 M NaOAc
o,o2 M EDTA in Aqua bidest.

mit 21 ml Aqua bidest. aufgefüllt, mit 1,5 ml 1 %igem Ammoniumpersulfat und 3o µl TEMED (Serva) versetzt und in entsprechenden Formen zu Platten gegossen (Länge x Breite x Dicke = 14,5 x 13 x o,2 cm; Taschen von 1 cm Breite). Die Polymerisierung erfolgte in ca. 2 bis 3 h bei Raumtemperatur.

8.6.2. Elektrophorese und Auswertung

Nach einem 3o-minütigen Vorlauf mit Elektrophoresepuffer bei 8o V wurden die Nukleinsäureproben aufgetragen (ca. 2 µg DNA pro Geltasche). Diese waren zuvor mit 2 Volumen 7o %igem Äthanol gefällt und in einem entsprechendem Volumen Elektrophoresepuffer wieder aufgenommen worden. Die Laufzeit für die Molekulargewichtsbestimmung betrug 4 h bei 11o V. Zur Anfärbung der Nukeinsäurebanden wurden die Gele für 15 min in eine Lösung von 1 mg Äthidiumbromid/ml H_2O gelegt. Die Laufstrecken der definierten Referenzmoleküle wurden graphisch gegen den Logarithmus ihres Molekulargewichts aufgetragen. Aus dieser Kurve konnte das Molekulargewicht der Proben abgelesen werden.

9. Bestimmung des molaren Guanin+Cytosin-Gehalts der DNA

9.1. Thermische Denaturierung von DNA

Der G+C-Gehalt aller untersuchten DNA-Spezies wurde mithilfe des bei der thermischen Denaturierung auftretenden Hypochromizitätseffektes bestimmt (Mandel und Marmur, 1968). Beim Erhitzen einer DNA-Lösung werden die Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleinbasen der Doppelhelix getrennt und die entstehenden Einzelstränge liegen in unregelmäßig kondensierter Tertiärstruktur vor. Aus den jetzt ungeordneten Positionen der planaren Basen resultiert eine Zunahme der UV-Absorption: Hyperchromizitätseffekt (gemessen bei 26o nm).

Der Übergang von der geordneten in die ungeordnet Molekülstruktur findet in einem engen Temperaturbereich statt. Die Temperatur, bei der 5o % der Hyperchromizität erreicht sind, T_m, ist linear abhängig vom G+C-Gehalt der DNA (d.h. vom Anteil der festeren G≡C-Paarungen mit 3 Wasserstoffbrücken gegenüber den A=T-Paarungen mit nur 2 Wasserstoffbrücken). Da der T_m außerdem von der Ionenstärke der Lösung und der Art des enthaltenen Kations beeinflußt wird, finden Schmelzpunktbestimmungen stets in definiertem Medium statt.

In 1xSSC ergibt sich folgende Abhängigkeit: Mol % G+C = $(T_m - 69,3) \times 2,44$;

Für DNA-Proben mit sehr hohem G+C-Gehalt kommt o,1 x SSC als Inkubationsmedium zur Anwendung. Hierbei liegen die T_m-Werte um $15,4^{\circ}C$ niedriger als in 1xSSC, so daß Mol % G+C = $(T_m - 53,9) \times 2,44$;

Die Abhängigkeit des DNA-Schmelzpunktes von der Na^+-Konzentration im Lösungsmittel wird entsprechend der Formel von Schildkraut und Lifson (1965) berücksichtigt. Danach ist Mol % G+C = $2,44\ (T_m - 81,5 - 16,6 \log M)$. (M = Konzentration der Na^+-Ionen).

9.2. Ermittlung des Denaturierungsverlaufs (Schmelzkurve)

Der G+C-Gehalt der DNA von Eubacterium limosum wurde in 1 x SSC bestimmt, alle anderen DNA-Spezies in o,1 x SSC. In 3 ml Probenvolumen wurden 3o µg DNA gelöst, so daß sich eine Anfangsextinktion von $E^{25^oC}_{26o_{nm}}$ = o,2 ergab.

Die Messungen wurden jeweils in zwei Parallelproben gegen 1 x SSC bzw. o,1 x SSC in einem Spektralphotometer (Zeiss, PM 4 Q III) durchgeführt. Um Wasserverdunstung zu vermeiden, waren die Quarzküvetten mit Plastikstopfen, durch die geeichte Thermometer in die DNA-Lösung eingeführt wurden, dicht verschlossen. Die Temperaturerhöhung in den Proben erfolgte mittels eines heizbaren Küvettenhalters, der mit einem thermostatisierten Glycerin/H_2O-Bad verbunden war.

Nachdem die genaue Extinktion bei der Bezugstemperatur von 25°C ermittelt worden war, wurde die Temperatur zunächst in Abständen von 2o min auf 5o°C und dann auf 75°C erhöht, was bei den untersuchten Organismen ca. 1o°C unter T_m entspricht. Die weitere Temperaturerhöhung erfolgte jeweils um 1°C im Abstand von 1o min, um die Temperaturangleichung sicherzustellen. Die Messungen wurden beendet, wenn bei Temperaturerhöhung keine Extinktionszunahme mehr festzustellen war.

9.3. Berechnung des G+C-Gehalts

Versuche in mehreren Parallelen ergaben, daß die Berücksichtigung von Wasserverdunstung und thermischer Ausdehnung beim Erhitzen der DNA-Lösung Werte lieferte, deren Unterschied zu den unkorrigierten Werten sich innerhalb der Meßgenauigkeit der Methode ($T_m \pm$ o,5°C) bewegte. Deshalb wurde auf die bisher im Arbeitskreis übliche entsprechende Korrektur der Meßwerte verzichtet.

Zur Ermittlung des Schmelzpunktes einer DNA-Lösung wurde die relative Extinktion E_{rel} graphisch gegen die dazugehörigen Temperaturwerte aufgetragen:

$E_T = E_{260\ nm}$ bei der jeweils abgelesenen Temperatur

$E_{rel} = \frac{E_T}{E_{25^oC}}$; $E_{25^oC} = E_{260\ nm}$ bei 25^oC

T_m entspricht der Temperatur, bei der 5o % der maximalen Extinktionszunahme erreicht sind.
Als Anschauungsbeispiel ist in Abb. 3 die T_m-Bestimmung für C.sepedonicum dargestellt:

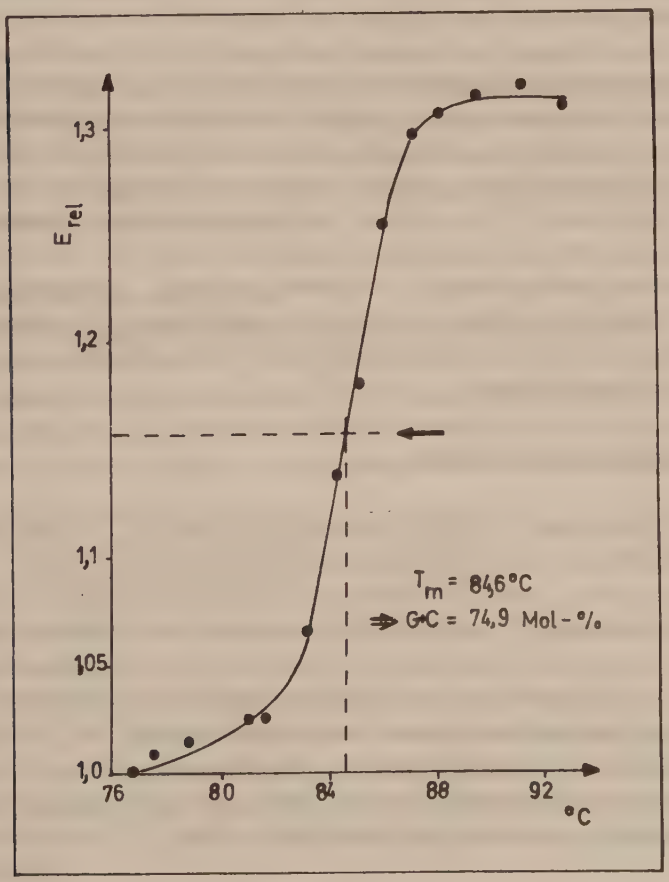


Abb.3:

Ermittlung des G+C-Gehalts der DNA anhand des Verlaufs der thermischen Denaturierung (Schmelzkurve). ←: 5o % der maximalen Extinktionszunahme

Aus den T_m-Werten wurde der G+C-Gehalt nach den bereits zitierten Formeln (B.9.1.) berechnet.

1o. Beladen der Nitrocellulosefilter mit hochmolekularer DNA

1o.1. Alkalische Denaturierung der DNA

Unmittelbar vor dem Beladevorgang wurden die DNA-Präparationen mit Isopropanol gefällt und in o,1 x SSC gelöst, weil es für die gute Haftung der DNA auf den Filtern wesentlich ist, "frische", unfragmentierte DNA zu verwenden (Gillespie und Gillespie, 1971).

Die Denaturierung der hochmolekularen DNA erfolgte nach der Methode von Birnstiel et al. (1972). Pro Nitrocellulosefilter (Ø 5o mm, Porenweite o,2 µm, Fa. Sartorius) wurden 6oo µg DNA (in o,1 x SSC) mit Aqua bidest. auf 3,1 ml aufgefüllt und mit 3,1 ml 1,o N NaOH 15 bis 2o min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung der alkalidenaturierten DNA wurde mit 25,8 ml eisgekühlter Pufferlösung (2 Volumen 3 N NaCl, 1 Volumen 1 N HCl, 1 Volumen 1 M Tris, jeweils in Aqua bidest.) teilweise neutralisiert, die Einstellung des pH = 7,o erfolgte unter Eiskühlung mit 6 N HCl.

1o.2. Behandlung der Filter

In der Zwischenzeit wurden die Membranfilter in 3 x SSC 15min äquilibriert und dann auf der Filtrierbank mit je 3o ml kaltem 3 x SSC - durch Anlegen eines leichten Vakuums mit der Wasserstrahlpumpe - durchgespült. Anschließend wurde die DNA-Lösung (32 ml pro Filter mit Ø 5o mm) mit einer Geschwindigkeit von ca. 1 ml/3 min durch die Nitrocellulosefilter gesaugt. Nach Beendigung des Beladevorgangs wurde noch zweimal mit je 15 ml kaltem 3 x SSC nachgewaschen. Um Verunreinigungen der Filter zu vermeiden, waren alle verwendeten Lösungen vor Gebrauch über Membranfilter derselben Art gereinigt worden.

Die beladenen Filter wurden über Nacht an staubfreiem Ort getrocknet und anschließend 4 h im Vakuum bei 8o°C "eingebrannt", um Ablösung der DNA vom Filter während der Hybridisierung zu vermeiden. (Gillespie und Gillespie, 1971). Die Aufbewahrung der Filter erfolgte bei 4°C im Vakuum.

1o.3. Bestimmung der DNA-Menge pro Filter

Die pro Filter eingesetzte DNA-Menge war so berechnet, daß die zur Hybridisierung eingesetzten Teilfilter (Ø 5,5 mm, ausgestanzt mit einer Lochzange) ca. 15 µg DNA enthielten. Der DNA-Gehalt der Teilfilter wurde anhand von jeweils zwei Parallelproben aus unterschiedlichen Regionen des großen Filters mithilfe der Diphenylamin-Reaktion (Burton, 1968) kontrolliert. Dazu wurden die Filter jeweils in 1 ml o,5 N $HClO_4$ 2o min bei 7o°C inkubiert und dann weiterbehandelt, wie unter B.8.2. beschrieben.

11. DNA/DNA-Hybridisierung

11.1. Präinkubation der Filter nach Denhardt (1966)

Eine unspezifische Adsorption der radioaktiven DNA an freie Stellen des Filters kann vermieden werden durch 2- bis 6-stündige Inkubation der Filter in einer Lösung von :

- o,o2 % Ficoll, MG 4oo ooo (Sigma)
- o,o2 % Polyvinylpyrrolidon (Sigma)
- o,o2 % Rinderserumalbumin (Sigma)

im jeweiligen Hybridisierungspuffer (ohne FA) (siehe B.11.3.).

Dazu wurden die Teilfilter einzeln in Eppendorfgefäßen mit o,5 ml der Denhardt-Lösung allseitig luftblasenfrei bedeckt und - nach der entsprechenden Inkubationszeit bei Hybridisierungstemperatur (s.B.11.3.) - über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Aus praktischen Gründen wurde die Hybridisierung jeweils morgens angesetzt.

11.2. Hitzedenaturierung der radioaktiven DNA

Entsprechend der spezifischen Aktivität der einzelnen Präparationen wurden o,1 bis 1,o µg DNA_s pro Filter eingesetzt, so daß pro Reaktionsansatz stets mindestens 3ooo cpm vorlagen. Die berechnete Menge ^{3}H-DNA wurde mit Aqua bidest., 18 x SSC und Formamid auf das benötigte Volumen und die SSC/FA-Konzentration des Hybridisierungsmediums eingestellt (s.B.11.3.). In durch Schraubdeckel mit Teflondichtungen luftdicht verschließbaren Sovirell-Röhrchen wurden diese Lösungen 3 x lo min im kochenden Wasserbad erhitzt, um die DNA-Doppelstränge vollständig zu trennen. Zur Verhinderung der Renaturierung wurden die Röhrchen zwischenzeitlich und bis zum Gebrauch in Eiswasser gestellt. Für sehr große Versuchsansätze wurde eine zehnfach konzentrierte ^{3}H-DNA-Lösung in Hybridisierungsmedium in gleicher Weise geschmolzen und anschließend mit kaltem Reaktionspuffer verdünnt.

11.3. Durchführung der Hybridisierung

Alle Hybridisierungen wurden bei 25°C unter dem T_m der eingesetzten DNA durchgeführt. Dabei wurde den Berechnungen der optimalen Reaktionsbedingungen (s.C.5.2.) der mittlere G+C-Gehalt aller untersuchten DNA-Spezies von 74% zugrunde gelegt. Folgende Reaktionsbedingungen kamen alternativ zur Anwendung:

1) Reaktionspuffer: 3xSSC/5o% FA; Hybridisierungstemp.: 47°C
2) Reaktionspuffer: 3xSSC/3o% FA; Hybridisierungstemp.: 6o°C

(Bei der Herstellung des Reaktionspuffers werden 5 bzw. 3 Teile FA mit 5 bzw. 7 Teilen einer Mischung von Aqua bidest. und 18 x SSC versetzt, welche so zusammengestellt ist, daß im fertigen Puffer eine Salzkonzentration von 3 x SSC vorliegt.)

Während der Zeit, die zur Denaturierung der ^{3}H-DNA erforderlich war, wurde die Präinkubationslösung mithilfe einer Wasserstrahlpumpe aus den Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesaugt. Dann wurden zu

jedem Filter o,2 ml der Hybridisierungslösung pipettiert, die Gefäße sorgfältig verschlossen, in ihrem Gestell mit Glasplatten beschwert und vollständig in ein Wasserbad eingetaucht, in dem die Hybridisierungstemperatur sorgfältig eingestellt worden war. Für jede zu bildende Hybridspezies wurden mindestens zwei Parallelproben angesetzt; zur Bestimmung des "DNA-noise" (unspezifische Bindung der DNA an die Filter) wurden mehrere unbeladene Teilfilter von der Präinkubation an mitgeführt. Von jeder Hybridisierungslösung wurde die pro Ansatz (o,2 ml) enthaltene Radioaktivitätsmenge genau bestimmt.

Nach 24 h bis 36 h Reaktionsdauer wurde die ^{3}H-DNA-Lösung mithilfe einer Wasserstrahlpumpe in ein Auffanggefäß abgesaugt und die Filter in den Eppendorfgefäßen mit jeweils 1 ml eisgekühltem 3 x SSC gewaschen. Anschließend wurden sie einzeln in Szintillationsgefäße überführt, mindestens 2 h im Vakuum bei 6o°C getrocknet und dann in 4 ml Rotiszint 11 (Fa.Roth) gezählt.

Für die Berechnung der Homologiewerte wurde jeweils einer der Parallelfilter nach Bestimmung der gebundenen Radioaktivität in Toluol gewaschen, getrocknet und nach Burton auf seinen DNA-Gehalt überprüft.

11.4. Berechnung der Homologiewerte

Die pro Filter gebundene Radioaktivitätsmenge wurde um den am Leerfilter gezählten Betrag korrigiert und zum Ausgleich der unterschiedlichen Beladung der Filter mit hochmolekularer DNA auf 1o µg DNA_F bezogen. Diese korrigierten Werte wurden dann mit der prozentualen Bindung (cpm/1o µg DNA_F) jeder ^{3}H-DNA an die jeweils homologe DNA_F verglichen. Dementsprechend ist

$$\% \text{ Homologie} = \frac{\% \text{ Bindung der } ^{3}\text{H-DNA an die heterologe } DNA_F}{\% \text{ Bindung der } ^{3}\text{H-DNA an die homologe } DNA_F} \times 1oo;$$

12. Bestimmung des $T_{m(e)}$ der Hybride

Zur Charakterisierung der Hybride wurden teilweise Schmelzkurven durch thermisches Eluieren der radioaktiven DNA ermittelt. Diejenige Temperatur, bei der 5o % der filtergebundenen Radioaktivität eluiert sind, bezeichnet man als $T_{m(e)}$.

Nach Bestimmung der gebundenen Radioaktivität, Waschen in Toluol und Trocknen wurden jeweils alle verfügbaren Parallelfilter einer Hybridspezies in ein Szintillationsglas mit 1 ml Hybridisierungspuffer eingebracht. Die Eluierung der ^{3}H-DNA erfolgte im thermostatisierten Wasserbad, beginnend 5°C unter Hybridisierungstemperatur in 5°C-Schritten bis 9o°C. Nach lo min Verweildauer bei der jeweiligen Temperatur wurden die Filter mit einer Pinzette in neue, vorgewärmte Gläschen überführt.

Die bei jedem Temperaturschritt in 1 ml Hybridisierungspuffer eluierte Radioaktivitätsmenge wurde nach Zugabe von lo ml Szintillationsflüssigkeit für wasserhaltige Proben (Rotiszint 22) bestimmt und, ausgedrückt in % der Gesamtaktivität, gegen die abgelesene Temperatur graphisch aufgetragen. Aus dieser Kurve konnte dann analog B.9.3. der $T_{m(e)}$ ermittelt werden.

13. Präparation radioaktiv markierter rRNA

Zur Inaktivierung von Nukleasen wurden alle bei der Aufarbeitung verwendeten Geräte und Lösungen in geeigneter Weise sterilisiert (Autoklavieren, Trockensterilisieren, Abreiben mit Alkohol, Einlegen in Extran). Außerdem wurden während der Präparation stets Handschuhe getragen.

13.1. Anzucht und Ernte der Zellen

Die Zellen für die Präparation von ^{3}H-rRNA wurden in jeweils 1oo ml Medium angezogen, das in 1 l-Erlenmeyerkolben bei 3o°C geschüttelt wurde. Zur radioaktiven Markierung der RNA wurden dem Medium vor dem Animpfen steril o,7 mCi [5,6-^{3}H]-Uracil (New England Nuclear) zugesetzt. Die Ernte der Zellen erfolgte während der logarithmischen Wachstumsphase bei einer $O.D._{578\ nm}$ = o,7 bis o,9 (siehe C.7.1.1.).

13.2. Zellaufschluß

Unmittelbar nach der Ernte wurden die Zellen durch einmalige Passage der Frenchpress-Zelle aufgeschlossen (siehe B.6.1.). Dazu wurden die abzentrifugierten Zellen in o,8 ml Elektrophoresepuffer (o,o4 M Tris, o,o2 M NaAc x 3 H_2O, o,ool M EDTA, o,2 % SDS in Aqua bidest., pH 7,2 mit Eisessig) suspendiert, dem o,2 ml Macaloid (1 mg/ml-Baroid Division National Lead Company, Houston, Texas), 5o µl lo %ige SDS-Lösung und ca. 2o µg Proteinase K beigefügt waren. Das in 5 ml kaltem, mit Aqua bidest. gesättigtem Phenol aufgefangene Homogenat wurde mit dem Whirlimix gründlich durchmischt und sofort bei -2o°C eingefroren. In diesem Zustand konnte es bis zur weiteren Aufarbeitung mehrere Tage lang aufbewahrt werden.

13.3. Herstellung des PAA-Gels (Bishop et al. 1967)

Die Auftrennung der, durch die Phenolbehandlung deproteinisierten, rRNA-Spezies erfolgte über Polyacrylamid (3 %)-Plattengelelektrophorese. Pro Gel wurde eine Lösung von 4,2 g Acrylamid (BIORAD) und o,21 g Bisacrylamid (Serva) in 15o ml Gelpuffer (o,o4 M Tris, o,o2 M NaAc x 3 H_2O, o,ool M EDTA in Aqua bidest., pH 7,2 mit Eisessig) hergestellt und im Vakuum entgast.

Zum Start der Polymerisierung wurden 24o µl 5o %ige Ammoniumperoxodisulfatlösung sowie 12o µl TEMED (Serva) zugegeben, die Lösung vorsichtig durchmischt und in die vorbereiteten Formen gegossen (Länge x Breite x Dicke = 18 x 18 x o,2 cm, Taschen von 3,5 cm Breite). Nach 2 bis 3 h Polymerisierung bei Raumtemperatur und Ausspülen der Taschen mit Elektrophoresepuffer (s.B.13.2.) erfolgte ein 6o min-Vorlauf bei 8o mA (2oo V). Danach wurde die Nukleinsäurelösung aufgetragen.

13.4. Auftrennung der ^{3}H-rRNA-Arten (Balch et al., 1977a)

Das mit Phenol versetzte Zellhomogenat wurde nach dem Auftauen bei 2o ooo x g in der Sorvall-Zentrifuge (2°C) abzentrifugiert. Nachdem die wässrige Phase, die die Nukleinsäuren enthält, nochmals mit 5 ml wassergesättigtem Phenol ausgeschüttelt worden war, wurde das in ihr gelöste Phenol durch dreimalige Extraktion mit ca. 15 ml Äther entfernt und der in Lösung verbliebene Äther abgeblasen. Die gereinigte Nukleinsäurelösung (ca. 1 ml) wurde dann mit 1o µl Bromphenolblau (o,8 %) und 5o µl Glycerin versetzt und auf die drei Taschen eines Gels verteilt. Bis zum Eindringen der Banden in das Gel wurde eine Stromstärke von 4o mA eingestellt, die Auftrennung der ^{3}H-rRNA-Arten erfolgte bei 8o mA (12o V) in 12 bis 16 h. Dann wurden die Gele auf eine Celluloseplatte mit Fluoreszenzindikator (Merck) gelegt und die Lage der Banden unter der UV-Lampe (345 nm) markiert (Abb.4). Um die erhaltenen Banden sicher der 16S- bzw. 23S-rRNA zuordnen zu können, wurde als Referenz die entsprechende E.coli-RNA mitgeführt.

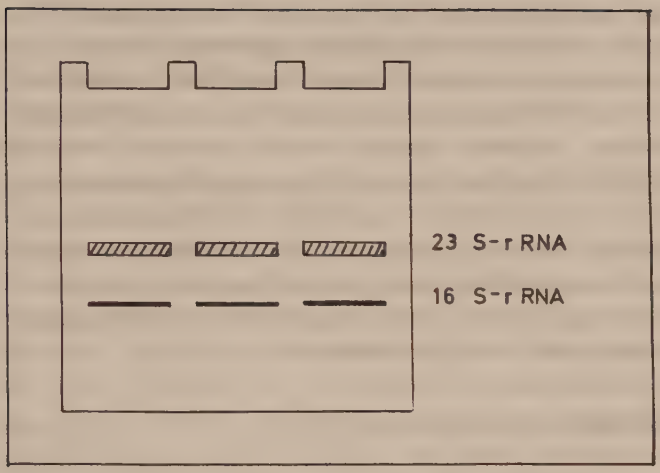


Abb.4:
Schematische Darstellung des Bandenmusters auf dem Gel.

Die Banden der 23S- und 16S-rRNA wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mindestens 2 h bei -7o°C eingefroren.

13.5. Elektroeluierung der RNA aus den PAA-Gelstücken (Stackebrandt, pers.Mitteilung)

Die gefrorenen Gelstücke wurden mit einer Rasierklinge zerkleinert und in Dialyseschläuchen mit o,1 M Ammoniumformiat dicht gepackt eingeschlossen. Diese wurden in eine Elektrophoresewanne quer zur Stromrichtung gelegt, mit Objektträgern beschwert und mit o,1 M Ammoniumformiatlösung bedeckt. Bei Anlagen einer Spannung von 2o V ergab sich eine Stromstärke von 2oo mA. Unter diesen Bedingungen wurden die Gelstücke 2o h bei Raumtemperatur eluiert. Eine Umpolung der Spannungsquelle 5 min lang vor Beendigung der Elektrophorese sollte ein Anhaften der RNA am Dialyseschlauch verhindern.

Der Inhalt der Schläuche wurde 3o min bei 48 ooo x g, 2°C, abzentrifugiert. Nachdem der Überstand umgehend in 5 ml eisgekühltes, wassergesättigtes Phenol überführt worden war, wurden die sedimentierten Gelstücke mit 2 ml o,1 M Ammoniumformiat gewaschen, nochmals abzentrifugiert und der Überstand mit der ersten Fraktion des Eluats vereinigt. Nach Phenolausschüttelung und Ätherextraktion wurde die ^{3}H-RNA-Lösung mit 2 Volumen Äthanol versetzt und 3o min bei -2o°C aufbewahrt. Danach wurde die ausgefällte RNA abzentrifugiert, unter Vakuum getrocknet und in ca. 1 ml Aqua bidest. aufgenommen. Diese Lösung wurde bei -2o°C aufbewahrt.

13.6. RNA-Isolierung nach Locker (1979)

Alternativ hierzu wurde die von Locker (1979) publizierte Methode zur RNA-Isolierung durchgeführt:

Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgt hier in einem Agarose-Plattengel. Der 1 %igen Agaroselösung (BIORAD) wurden 6 M Harnstoff zugesetzt, der teilweise denaturierend wirkt und zur Verbesserung der Bandenschärfe beiträgt, sowie o,o5 M Jodoacetat (Serva) zur Inaktivierung von RNasen. Nach einem einstündigen Vorlauf (4o mA, loo V) wurde die mit Phenol ausgeschüttelte Nukleinsäurelösung aufgetragen und in 2o h bei 4o mA (loo-16o V) aufgetrennt.

Der Vorteil dieser Methode gegenüber der PAA-Elektrophorese ist die einfache Extraktion der RNA aus der Agarose. Durch Einfrieren wird die Gelstruktur zerstört, so daß die Nukleinsäure nach Zentrifugieren der homogenisierten und wieder aufgetauten Gelstücke aus dem Überstand gewonnen werden kann. Da es jedoch erforderlich ist, die Gele nach dem Gießen über Nacht erstarren zu lassen und da die Elektrophoresedauer mindestens 2o h beträgt, beansprucht die gesamte Isolierung

nicht weniger Zeit als mit PAA-Elektrophorese und anschließender Elektroeluierung. Darüberhinaus ergaben sich im PAA-Gel schärfere Banden. Deshalb wurde auf eine weitere Ausarbeitung dieser Methode verzichtet.

13.7. Vorbereitung der ^{3}H-RNA zur Hybridisierung

Da nur sehr geringe ^{3}H-RNA-Mengen isoliert wurden, konnte keine chemische Bestimmung der RNA-Konzentration vorgenommen werden. Die Charakterisierung der RNA-Präparationen erfolgte deshalb spektrometrisch nach denselben Prinzipien wie bei der DNA. Aufgrund der geringeren Sekundärstruktur der RNA entspricht dabei $E_{260\ nm} = 1{,}0$ einem RNA-Gehalt der untersuchten Lösung von 40 µg/ml. Nach Bestimmung der spezifischen Aktivität (B.8.5.) wurde die RNA, gelöst in Aqua bidest., fragmentiert (B.7.3.) und bei -20°C aufbewahrt.

14. DNA/rRNA-Hybridisierung

14.1. Reaktionsbedingungen

Für die Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen wurde ein G+C-Gehalt der RNA von 53 % angenommen (De Ley und De Smedt, 1975). Bei einer Hybridisierungstemperatur von 60°C und Reaktion 25°C unter T_m erweist sich dann ein Inkubationspuffer mit einem FA-Gehalt von 25 % und einer Na^+-Konzentration entsprechend 5 x SSC als am besten geeignet (Buhl, 1980).

14.2. Durchführung der Hybridisierung

Da RNA nicht unspezifisch an Nitrocellulosefilter bindet, ist eine Präinkubation nach Denhardt nicht notwendig. Die RNA wurde in gleicher Weise wie die ^{3}H-DNA im Hybridisierungsmedium denaturiert (B.11.3.). Pro DNA-Teilfilter

(Ø 5 mm) wurden o,2 µg RNA/o,2 ml 5 x SSC/25 % FA eingesetzt, wobei 3 Parallelproben für jeden Wert angelegt wurden. Die Hybridisierungsdauer betrug 12 h.

14.3. Nachbehandlung der Filter

Die Nachbehandlung der Filter erfolgte nach Beobachtungen von Gillespie und Gillespie (1971) sowie De Ley und De Smedt (1975) (s.C.7.2.3.):

Nach beendeter Hybridisierung wurde die RNA-Lösung abgesaugt und die Filter mit jeweils 1 ml Hybridisierungsmedium (ohne RNA) lo min bei 6o°C nachinkubiert. Dann wurden die Filter im selben Puffer gewaschen und in neuen Eppendorfgefäßen mit 1 ml RNase-Lösung versetzt (o,25 µg RNase A und 5 U RNase T_1 (Serva) pro ml 2 x SSC). Nach 25 min Inkubation bei 37°C und Waschen in 2 x SSC wurden die Filter bis zur Bestimmung der prozentualen Bindung der RNA an die DNA_F weiterbehandelt wie unter B.11. beschrieben.

15. Bestimmung des $T_{m(e)}$ der Hybride

Für alle DNA/rRNA-Hybride wurden die $T_{m(e)}$-Werte ermittelt (s.B.12). Die Eluierung der RNA erfolgte dabei jedoch nach De Ley und De Smedt (1975) in jeweils 1 ml 1,5 x SSC/2o % FA bei jedem Temperaturschritt.

C. E R G E B N I S S E

1. Zellwandzusammensetzung der untersuchten Organismen

1.1. Gruppierung der untersuchten Stämme entsprechend ihrem Mureintyp

Tabelle 3 zeigt die Einteilung der untersuchten Organismen, ihrem Mureintyp entsprechend.

Variation	Mureintyp 1)	Gruppe	Organismus
B 1 α	(Gly) [L-Lys] D-Glu - Gly - L-Lys	I	M.lacticum C.laevaniformans E 36/1
B 1 ß	(Gly) [L-Hsr] D-Glu - Gly_2 - L-Lys	II	B.imperiale
	(Gly) [L-Hsr] D-Glu - Gly - L-DAB	III	C. bovis 2)
B 2 ß	(Gly) [L-Hsr] D-Glu - D-Orn	IV	B.citreum B.luteum B.pusillum C.betae C.flaccuumfaciens C.flac.var.aurantiacum C.oortii C.poinsettiae

Variation	Mureintyp 1)	Gruppe	Organismus
	(Gly) [L-Hsr] D-Glu - Gly - D-Orn	V	A.terregens B.albidum B.insectiphilum B.saperdae B.testaceum C.barkeri coryneformer Organismus DSM 20143 M.liquefaciens E 37/4 S 110
B 2 γ	(Gly) [L-DAB] D-Glu - D-DAB	VI	B.helvolum C.aquaticum C.insidiosum C.mediolanum C.michiganense C.nebraskense C.sepedonicum Ag.ramosus
B 2 α	(L-Ser) [L-Orn] D-Glu - D-Orn/D-Lys	VII	E.limosum
B 1 δ	(L-Ser) [L-Ala] D-Glu - Gly - L-Lys	VIII	E.rhusiopathiae

Tab.3:

Einteilung der untersuchten Organismen entsprechend ihrem Mureintyp in die Gruppen I bis VIII.

1) siehe Legende zu Tab.1; zusätzlich ist in runden Klammern die Aminosäure in Position 1 der Peptiduntereinheit angegeben.

2) der Typstamm der Spezies, C.bovis ATCC 7715, besitzt m-DAP-direkt-quervernetztes Murein

Die Murein-Primärstrukturen wurden aus Fiedler (1971), Schleifer und Kandler (1972), Fiedler und Kandler (1973) und von Fiedler (unveröffentlicht) übernommen.

Zum Identitätsnachweis der untersuchten Organismen wurde die qualitative und quantitative Aminosäurezusammensetzung ihrer tryptisch gereinigten Zellwände nachgeprüft (siehe B.4.). Dabei ergab sich für B.albidum, das ursprünglich Gruppe IV zugeordnet war, ein Molverhältnis von Glu+Hyg : Gly = 1,o : 1,9, anstelle des für diese Gruppe charakteristischen Verhältnisses Glu + Hyg : Gly = 1:1. Im Partialhydrolysat der tryptisch gereinigten Zellwände (Hydrolysebedingungen: o,3 ml 4 N HCl/3 mg ZW, loo°C, 3o min) konnte durch zweidimensionale Papierchromatographie in Isopropanol/Eisessig/Wasser (siehe B.4.2.) das Peptid Glu-Gly nachgewiesen werden. B.albidum wurde demzufolge in Gruppe V eingeordnet.

Neben bereits definierten Sammlungsstämmen wurden auch 25 Eigenisolate von Dr.H.Seiler, Weihenstephan, aus Molkereiabwasser in die vorliegenden Untersuchungen mit einbezogen. In numerisch taxonomischen Studien (Seiler, unveröffentlicht) war große Ähnlichkeit dieser Organismen zu beschriebenen B-Typ-Coryneformen nachgewiesen worden. Aufgrund der quantitativen Analyse ihrer tryptisch gereinigten Zellwände mithilfe des Aminosäureanalysators konnten diese Eigenisolate ausschließlich in die Gruppen I und V eingeordnet werden. Tabelle 4 zeigt repräsentativ bei drei Vertretern die molare Aminosäurezusammensetzung der Molkereiabwasser-Isolate.

Auf Anfertigung von Partialhydrolysaten der Zellwände wurde verzichtet, da die seltene Aminosäurezusammensetzung des Mureins in Verbindung mit den numerisch taxonomischen Befund und dem G+C-Gehalt der DNA (siehe B.2.) eine sichere taxonomische Charakterisierung der Isolate ermöglicht.

Tab.4: Molverhältnisse der Aminosäuren in den tryptisch gereinigten Zellwänden der Eigenisolate von Dr.H.Seiler aus Molkereiabwasser und deren Zuordnung zu den in Tab.3 aufgestellten Gruppen.

Y = unbekannte Aminoverbindung;
y = Molverhältnis von Y, bezogen auf den Glu+Hyg-Gehalt des Mureins.

Hsr läuft unter den Bedingungen, die bei der Aminosäureanalyse angewendet wurden, an dieselbe Stelle des Chromatogramms wie Muraminsäure und ist deshalb nicht zu quantifizieren.

Gruppe	Stamm	Molverhältnisse der Aminosäuren
I	E 36/1	Glu+Hyg:Gly:Ala:Lys = 1:2,3:o,8:2,o
V	E 37/4	Glu :Gly:Ala:Orn = 1:2,35:1,1:o,8
V	S 11o	Glu+Hyg:Gly:Ala:Orn:Y = 1:1,8:o,7:o,45:y

Wie aus Tab.4 hervorgeht, entspricht der Anteil der Diamimosäure Orn im Murein von S 11o nur etwa der Hälfte des Molverhältnisses von Glu + Hyg. Daneben erscheint im Chromatogramm die unbekannte Aminoverbindung Y, deren molarer Extinktionskoeffizient nicht bestimmt werden konnte. Schleifer (pers. Mitteilung) identifizierte diese Substanz als hydroxy-Ornithin, welches möglicherweise durch nachträgliche Hydroxylierung des Ornithins der Interpeptidbrücke (in Analogie zur Hydroxyglutaminsäure, siehe C.1.2.) entstanden sein könnte.

Die Stämme E 36/1, E 37/4 und S 11o wurden repräsentativ für die Molkereiabwasser-Isolate in die DNA/DNA-Homologieuntersuchungen mit einbezogen.

1.2. Auftreten nicht-obligater Zellwandkomponenten der B-Typ-Coryneformen

Bei der Überprüfung der Zellwandzusammensetzung der untersuchten Organismen mithilfe des Aminosäureanalysators wurden in den Chromatogrammen neben den für den jeweiligen Mureintyp charakteristischen Komponenten auch andere Ninhydrin-positive Substanzen nachgewiesen, die nur bei einzelnen Vertretern auftraten (Tab.5).

Tab.5: Vorkommen von Hydroxyglutaminsäure, Galactosamin und der unidentifizierten Aminoverbindung "X" (näheres siehe Text) in den tryptisch gereinigten Zellwänden coryneformer Organismen mit Mureinen der Gruppe B.

Gruppe	Stamm	Hyg	Gal-NH_2	"X"
I	M.lacticum	+		
	E 36/1	+		
	C.laevaniformans	+		
II	B.imperiale	+		
V	C.barkeri			
	S 110	+		
	B.albidum	+	+	
	B.saperdae	+	+	
	B.insectiphilum	+	+	
	M.liquefaciens	+	+	
	DSM 2o143	+	+	+
	A.terregens	+		+
	E 37/4			+
	B.testaceum			+

Hydroxyglutaminsäure, als partieller Ersatz von Glutaminsäure in Position 2 der Peptiduntereinheit, tritt ausschließlich bei Organismen der Gruppen I, II und V auf - mit Ausnahme von C.barkeri, E 37/4 und B.testaceum. Wie Schleifer et al. (1967) anhand von M.lacticum ermittelten, findet die Hydroxylierung der Glutaminsäure erst am fertig ausgebildeten Murein statt und scheint in ihrem Ausmaß stark von der Sauerstoffversorgung der Zellen während des Wachstums abhängig zu sein.

Galactosamin, eine akzessorische Zellwandkomponente, kommt nur bei fünf Vertretern der Gruppe V vor, nämlich B. albidum, B. saperdae, B. insectiphilum, M. liquefaciens und dem coryneformen Organismus DSM 2o143. Die genaue Lokalisierung dieser Substanz in der Zellwand ist nicht bekannt.

Die unbekannte, Ninhydrin-positive Substanz "X", die charakteristisch ist für die Zellwände von DSM 2o143, A.terregens, E 37/4 und B.testaceum wird im Aminosäureanalysator 54 min nach Wechsel von Puffer A (o,2 N Citratpuffer, pH 3,25) zu Puffer B (o,7 N Citratpuffer, pH 4,35), d.h. nach 3o % der Laufstrecke zwischen Glc-NH_2 und NH_3, bei einer Betriebstemperatur von 55°C, eluiert. Auch hierbei handelt es sich mit Sicherheit um eine akzessorische Zellwandkomponente und nicht um einen Bestandteil des Mureins.

2. G+C-Gehalt der DNA

Um einen groben Überblick über die genetische Verwandtschaft der untersuchten Organismen zu erhalten, wurde der G+C-Gehalt der DNA bestimmt. Tab.6 gibt den Befund zusammenfassend wieder.

Tab.6: G+C-Gehalt der DNA der untersuchten Organismen
1) Floßmann und Erler, 1972.

Gruppe	Stamm	% G + C
I	C.laevaniformans	73,7
	M.lacticum	74,9
	E 36/1	75,4
II	B.imperiale	75,4
III	C.bovis	73,7
IV	B.citreum	75,2
	luteum	74,9
	pusillum	74,2
	C.betae	73,7
	flaccuumfaciens	72,2
	flac.var.aurantiacum	72,2
	oortii	72,2
	poinsettiae	72,5
V	A.terregens	75,6
	B.albidum	72,5
	insectiphilum	72,o
	saperdae	72,5
	testaceum	72,7
	C.barkeri	74,4
	DSM 2ol43	75,6
	M.liquefaciens	72,5
	E 37/4	74,6
	S 11o	7o,5
VI	B.helvolum	72,2
	C.aquaticum	73,2
	insidiosum	76,1
	mediolanum	74,7
	michiganense	74,2
	nebraskense	76,6
	sepedonicum	74,9
	Ag.ramosus	76,7

Gruppe	Stamm	% G + C
VII	E.limosum	48,6
VIII	Erhusiopathiae	39[1)]

Bei den Organismen der Gruppen I bis VI liegt der G+C-Gehalt der DNA im engen Bereich zwischen 72 und 77 %, für Eubacterium limosum und Erysipelothrix rhusiopathiae wurden dagegen 49 bzw. 39 % bestimmt. Aufgrund dieses Befundes konnten letztere von vornherein aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden, da De Ley (1969) ermittelt hatte, daß es in Bakterien, deren Basenzusammensetzung der DNA sich um ca. 2o % unterscheidet, nahezu keine gemeinsamen Nukleotidsequenzen mehr gibt.

Als heterologe Kontrollstämme für die DNA-Homologieuntersuchungen wurden - um vergleichbare Versuchsbedingungen herzustellen - Vertreter der Gattung Cellulomonas ausgewählt, in der der G+C-Gehalt der DNA im selben Bereich liegt (Yamada und Komagata, 197o).

3. Versuche zur Gewinnung radioaktiv markierter DNA

In allen Versuchen zur Aufnahme von radioaktivem Adenin oder Thymidin wurden jeweils 3o ml Medium vor dem Animpfen steril mit lo µCi [2,8-^{3}H-] Adenin bzw. [6-^{3}H-] Thymidin versetzt, sofern nichts anderes vermerkt ist.

3.1. Aufnahme von Adenin und Thymidin bei Wachstum in "halbsynthetischem Medium"

Vorversuche mit C.barkeri, C.laevaniformans und C.insidiosum in halbsynthetischem Medium zeigten, daß Adenin durchschnittlich zu 7o %, Thymidin dagegen nur zu maximal 2o % aufgenommen wird. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei Cellulomonas- und Lactobacillus-Arten gemacht. Dabei ergaben Markierungen mit Thymidin, das im Gegensatz zu Adenin ausschließlich zur DNA-Biosynthese verwendet wird, trotz geringerer Aufnahme höhere spezifische Aktivitäten (Stackebrandt und Lauer, pers.Mitteilung). Deshalb wurde zur Herstellung radioaktiver DNA zunächst ^{3}H-Thymidin verwendet (1 mCi/3oo ml halbsynthetisches Medium). Die spezifischen Aktivitäten, die damit zu erreichen waren, betrugen in den meisten Fällen maximal $1o^{4}$ cpm/µg DNA (Tab.7). Um die ^{3}H-Thymidin-Aufnahme zu verbessern und damit möglicherweise höhere spezifische Aktivitäten der ^{3}H-DNA zu erzielen, wurden die folgenden Versuche durchgeführt:

3.2. Hemmung der Thymidin-Biosynthese durch 5-Fluor-Desoxyuridin (FdU)

FdU wird in den Zellen rasch zu F-dUMP phosphoryliert, das - bei E.coli - eine dreifach höhere Affinität zur Thymidilat-Synthetase hat als dUMP und daher die Thymidin-Biosynthese stark hemmt (Mathews und Cohen, 1962). Dieser Effekt wurde bei Staphylokokken und Peptokokken ausgenützt, um die Aufnahme von exogenem Thymidin und seinen Einbau in die DNA zu verbessern (Meyer, 1979; Kilpper, 198o).

Zur Überprüfung, ob sich FdU-Zusatz zum Kulturmedium auch bei den B-Typ-Coryneformen in dieser Weise auswirkt, wurden als Testorganismen B.albidum, B.imperiale und B.

saperdae eingesetzt. Mit der in Vorversuchen als optimal ermittelten FdU-Konzentration von o,1 µg/ml HD-Medium ließ sich jedoch keine Erhöhung der spezifischen Aktivität erzielen.

3.3. Einfluß der Medienzusammensetzung auf die Adenin- bzw. Thymidinaufnahme

Um den Einfluß der Medienzusammensetzung auf die ^{3}H-Adenin bzw. ^{3}H-Thymidin-Aufnahme zu untersuchen, wurden Nährlösungen folgender Zusammensetzung verwendet:

1) halbsynthetisches Medium (enthält o,ol % HE, o,1 % Pepton) und verarmte HD-Medien:
2) o,3 % HE, o,5 % Pepton
3) o,1 % HE, o,5 % Pepton
4) o,1 % HE, o,2 % Pepton

Als Teststämme dienten hierzu: B.citreum, B.luteum, B.pusillum, C.betae, C.flaccuumfaciens und C.flaccuumfaciens var. aurantiacum.

In allen Medien betrugen die Generationszeiten der einzelnen Organismen zwischen loo und 17o min; in der stationären Phase wurden optische Dichten (578 nm) von 1,5 bis 4,5 erreicht. Lediglich B.luteum wuchs im halbsynthetischen Medium mit einer Verdopplungszeit von 28o min nur bis O.D. = o,4. Abgesehen von dieser Ausnahme zeigte das Wachstum der Testorganismen in den verarmten Medien denselben Verlauf wie in normalem HD-Medium.

Die maximale Adenin-Aufnahme betrug durchschnittlich 23 %, Thymidin wurde nur bis zu 9 % dem Medium entzogen. Zur

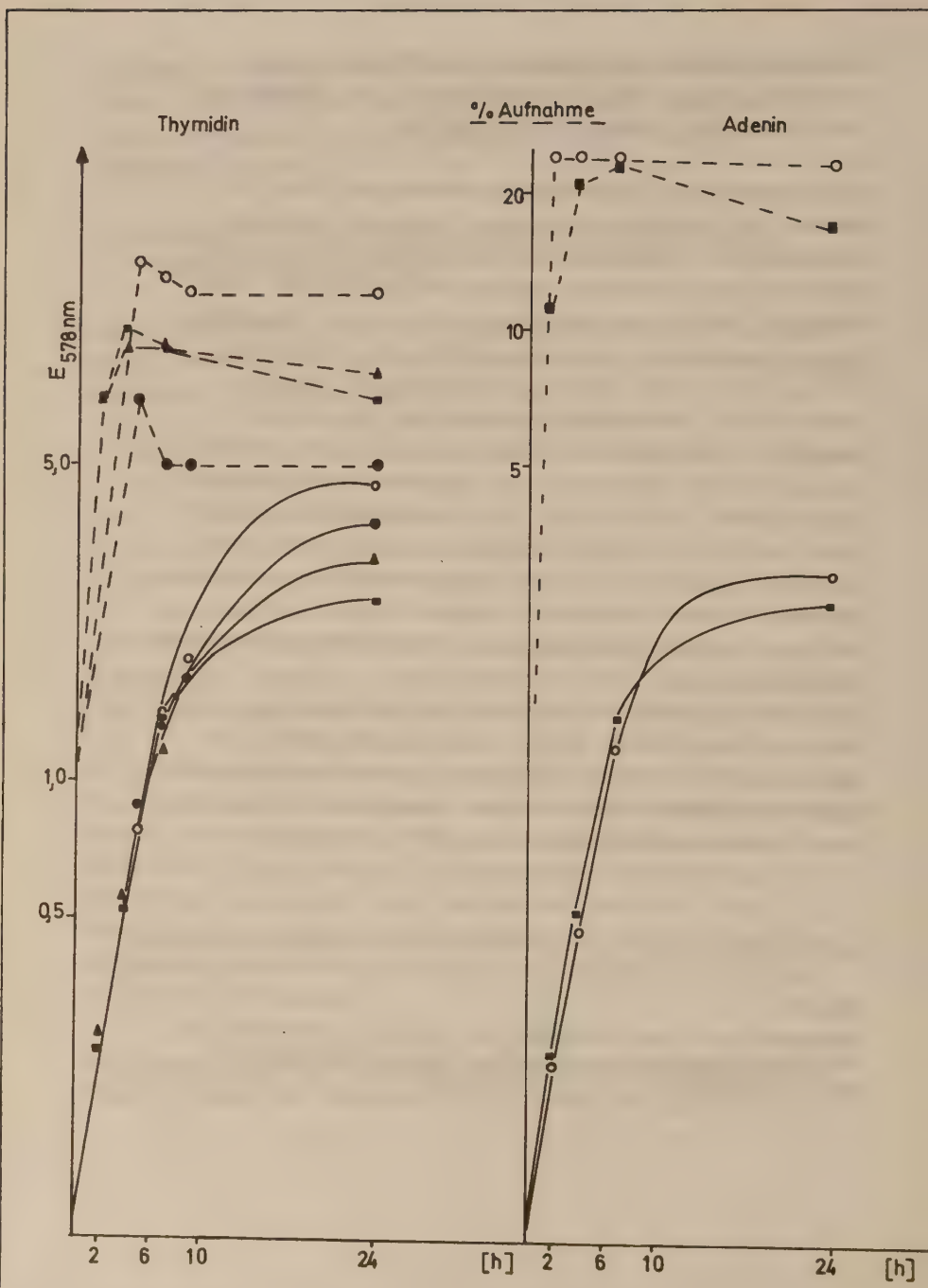
Veranschaulichung des Verlaufs von Wachstum und Aufnahme sind in Abb. 5 repräsentativ die Ergebnisse für B.pusillum graphisch dargestellt.

Es zeichnet sich allgemein die Tendenz ab, daß in Medien, die weniger Hefeextrakt (und somit weniger Thymidin bzw. thyminhaltige Verbindungen) enthalten, mehr markiertes Thymidin in die Zellen gelangt. Die Tatsache, daß in den Versuchen unter C.3.1. wesentlich bessere Aufnahmen erreicht wurden, ist mit größter Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, daß die unter C.3.3. verwendeten radioaktiven Substanzen länger als vom Hersteller empfohlen gelagert worden waren. Für das Thymidin wurde papierchromatographisch nachgewiesen, daß ca. 4o % der Radioaktivität inzwischen in Form von Zersetzungsprodukten vorlag. Das bedeutet, daß nicht 9 % des eingesetzten Thymidins aufgenommen wurden, sondern 9 % eines Präparates, das nur noch ca. 6o % der ursprünglichen Thymidinmenge enthielt.

Eine entscheidende Verbesserung der Aufnahme von Thymidin oder Adenin durch Variation der Medien im getesteten Rahmen war jedoch auch unter Berücksichtigung der minderen Qualität der verwendeten ^{3}H-Thymidin- bzw. ^{3}H.Adenin-Präparationen nicht zu erkennen.

Abb.5:

Wachstum (——) und Aufnahme von Adenin und Thymidin (--) von B.pusillum in: o-o: halbsynthetischem Medium 1), ●-●: HD-Medium 2), ■ - ■ : HD-Medium 3), ▲ - ▲ : HD-Medium 4).


Thymidin
% Aufnahme
Adenin
E 578 nm
5,0
1,0
0,5
20
10
5
2
6
10
24
[h]
2
6
10
24
[h]

3.4. Zugabe der radioaktiven Markierung zu wachsenden Zellen

Wie in anderen Labors gehandhabt (De Ley, 1971; Meyer, 1979), wurde ^{3}H-Adenin bzw. ^{3}H-Thymidin versuchsweise erst den logarithmisch wachsenden Kulturen zugesetzt ($O.D._{578\ nm}$ = o.5).Hierbei ergab sich für den Teststamm C.flaccuumfaciens var. aurantiacum jedoch eine Verschlechterung der Aufnahme: Es wurden dem Mediun nur 12 % Adenin bzw. 7 % Thymidin entzogen gegenüber 23 % bzw. 9 % unter C.3.3.

3.5. Papierchromatographische Untersuchung der radioaktiven Komponenten im Medium

Alle durchgeführten Aufnahmekinetiken zeigen erwartungsgemäß, daß Thymidin wie auch Adenin nur bis gegen Ende der logarithmischen Phase aufgenommen werden.Danach nimmt die Radioaktivität im Medium in den meisten der getesteten Fälle bemerkenswerterweise wieder zu. Wahrscheinlich ist dieses Phänomen auf beginnende Lyse der Zellen und den damit verbundenen Abbau ihrer DNA bzw. die Freisetzung des endogenen Thymidinpools zurückzuführen.

Bei der papierchromatographischen Untersuchung des Kulturüberstandes aus verschiedenen Wachstumsphasen ergab sich als dominierende ^{3}H-Komponente Thymidin - entsprechend einem R_f-Wert = o,85 (Literatur: o,8o) (Abb.6). In den Chromatogrammen aller Medienproben zeigte sich neben diesem Hauptpeak noch eine kleine Schulter bei R_f = o,7o, die vermutlich wiederum auf Zersetzungsprodukte im verwendeten Thymidin zurückzuführen ist.

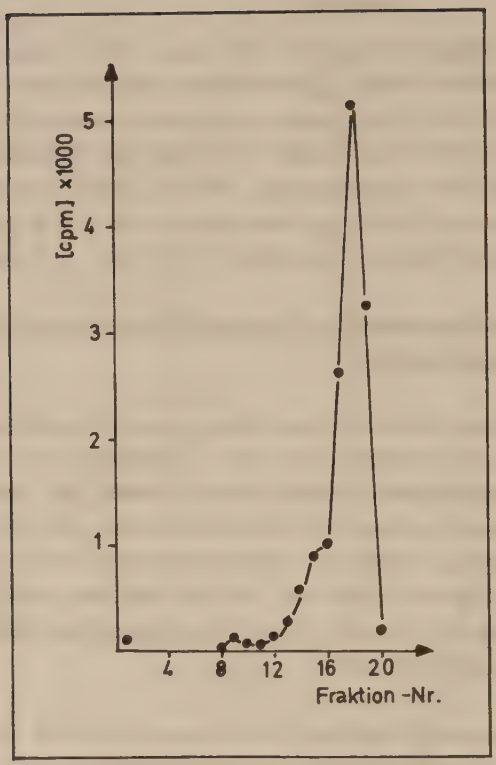


Abb.6:
Verteilung der ^{3}H-Aktivität im Papierchromatogramm des ^{3}H-Thymidin enthaltenden Markierungsmediums.
(Laufmittel: Äthanol, 96 %ig/1.o M Ammoniumacetat pH 7.5 = 7/3 (v/v)).

Gegenüber dem unbeimpften Medium waren keine neuen radioaktiven Komponenten zu erkennen. Umwandlung des exogenen Thymidins im Stoffwechselgeschehen der unter-

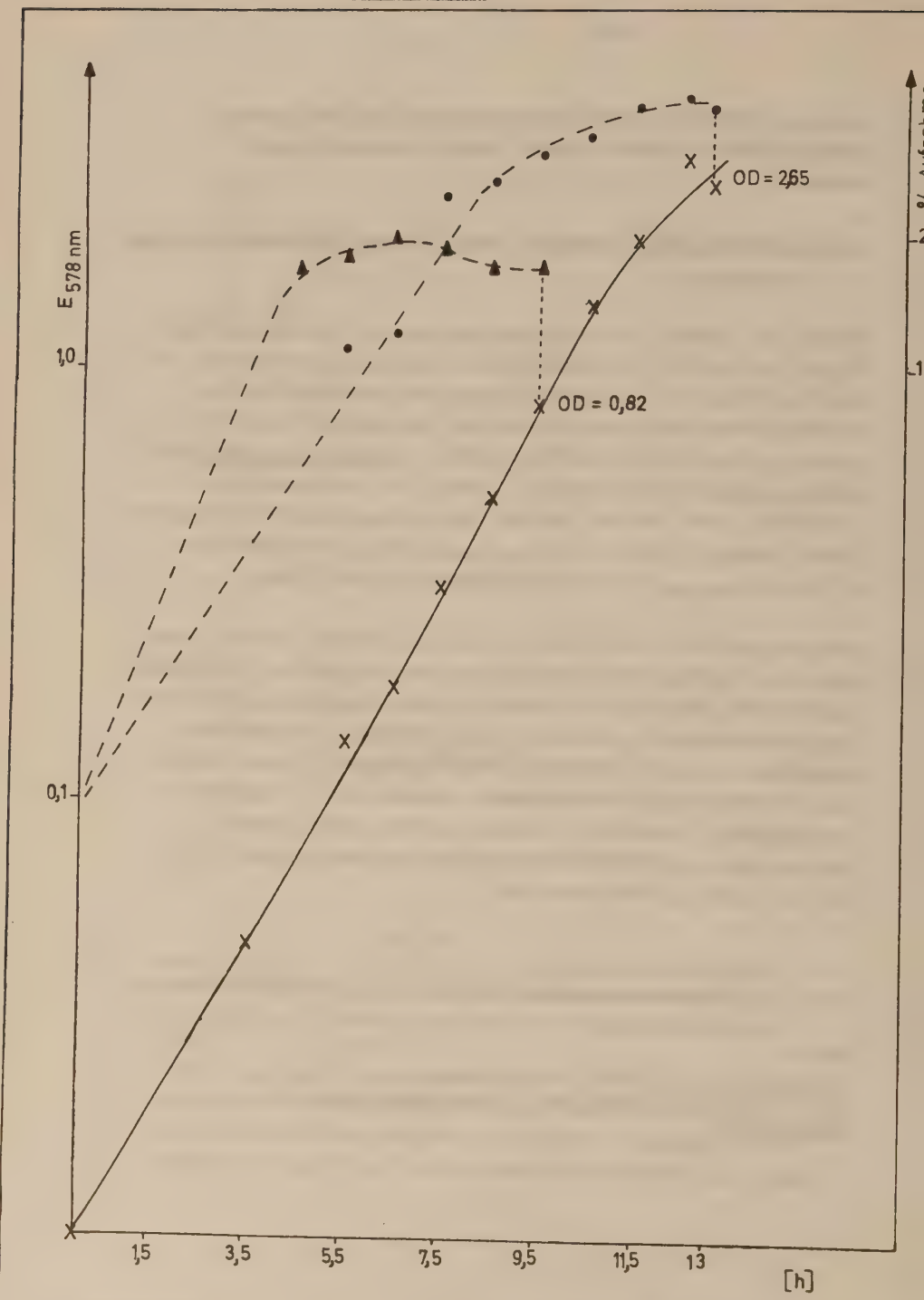
suchten Bakterien unter Ausschleusung der markierten Komponentenins Medium können danach ausgeschlossen werden.

3.6. Erhöhung der ^{3}H-Adenin- bzw. ^{3}H-Thymidin-Konzentration im Medium

Statt wie bisher 3oo ml Medium wurden in Parallelansätzen 5o ml mit o,7 mCi ^{3}H-Adenin bzw. ^{3}H-Thymidin versetzt. Ein drittes Kölbchen mit unmarkiertem Medium wurde zur Bestimmung der optischen Dichte der wachsenden Kulturen mitgeführt. Die Zellen des Teststammes C.flaccuumfaciens var. aurantiacum wurden geerntet, sobald die Radioaktivität im Medium nicht weiter abnahm. Zum entsprechenden Zeitpunkt waren Adenin zu 4o % ($O.D._{578\ nm}$ = 2,65) und Thymidin zu 17 % ($O.D._{578\ nm}$ = o,82) aufgenommen worden (Abb.7).

Die Präparation der ^{3}H-DNA aus diesen Zellen zeigte, daß mit der ^{3}H-Adenin-Markierung eine um den Faktor 2,6 höhere spezifische Aktivität erreicht werden konnte, als mit der ^{3}H-Thymidin-Markierung (1,6 x 10^{4} cpm/µg ^{3}H-Adenin-DNA gegenüber 6,2 x 10^{3} cpm/µg ^{3}H-Thymidin-DNA). Alle folgenden ^{3}H-DNA-Präparationen wurden deshalb mit ^{3}H-Adenin durchgeführt. Wie Tab. 7 zeigt, wurden unter diesen Bedingungen spezifische Aktivitäten im Bereich von 10^{4} bis 10^{5} cpm/ µg DNA erhalten.

Abb.7:
Wachstumsverlauf (x-x) und Aufnahme von ^{3}H-Adenin (●-●) und ^{3}H-Thymidin (▲-▲) bei C.flaccuumfaciens var. aurantiacum.


E 578 nm
1,0
0,1
OD = 2,65
OD = 0,82
1,5
3,5
5,5
7,5
9,5
11,5
13
[h]

Tab.7: Art der Markierung und spezifische Aktivität der in die Hybridisierungen eingesetzten ^{3}H-Präparationen.

Stamm	^{3}H-Markierung mit Adenin (A) bzw.Thymidin (T) [µCi]	Volumen des Mediums [ml]	spezifische Aktivität [cpm/µg DNA]
Ag. ramosus	T 1000	50	110 000
A. terregens	A 700	50	62 600
B. albidum	T 1000	300	1 300
citreum	A 700	50	25 500
helvolum	A 1000	300	15 000
imperiale	A 700	50	36 000
insectiphilum	A 700	50	25 000
luteum	A 700	50	30 500
pusillum	A 700	50	33 000
saperdae	T 1000	300	2 700
testaceum	A 700	50	28 000
C. aquaticum	T 1000	300	12 000
barkeri	T 1000	300	9 800
betae	A 700	50	32 000
bovis	A 700	50	29 000
flaccuumfaciens	A 700	50	25 000
flaccuumfaciens var. aurantiacum	A 700	50	16 000
insidiosum	T 1000	300	6 500
laevaniformans	T 1000	300	25 700
mediolanum	T 1000	300	4 200
michiganense DSM 20134	T 1000	300	9 700
ATCC 4450	A 700	50	26 500
ATCC 7429	A 700	50	30 400
nebraskense	A 700	50	38 000
oortii	T 1000	300	10 000
poinsettiae	T 1000	300	6 900
coryneformer Organismus DSM 20143	A 700	50	20 000
M. lacticum	A 700	50	33 000
liquefaciens	A 700	50	34 000
E 36/1	A 700	50	24 300
E 37/4	A 700	50	31 000
S 110	A 700	50	17 400

Nach Abschluß der vorliegenden DNA/DNA-Homologieuntersuchungen wurden aus O'Donovan (1978) folgende Möglichkeiten der DNA-Markierung mit Thymidin bzw. Thymin ermittelt:

In Wildtyp-Zellen von E.coli wird exogenes Thymin zu hohem Anteil in die DNA eingebaut, wenn man dem Medium gleichzeitig Deoxyribonucleoside zusetzt. Thymin allein kann aufgrund von Mangel an endogenen Deoxyribosylgruppen kaum in die DNA integriert werden.

Thymidin wird bei E.coli zwar sofort in die DNA eingebaut, jedoch andererseits durch die induzierbare Thymidin-Phosphorylase rasch zu Thymin abgebaut (Thymidin + P_i ⇌ Thymin + Deoxyribose-1-P). Durch exogenes Uridin ist dieses Enzym kompetitiv zu hemmen, so daß das aufgenommene Thymidin dem Zellstoffwechsel längere Zeit zur Verfügung steht.

Versuche zur DNA-Markierung mit Thymin bzw. mit Thymidin bei gleichzeitiger Zugabe von Uridin zum Medium wurden für die B-Typ-Coryneformen nicht durchgeführt, da die benötigte ^{3}H-DNA zum betreffenden Zeitpunkt bereits präpariert worden war.

3.7. Effektivität der Reinigungsschritte im Verlauf der ^{3}H-DNA-Präparation von C.flaccuumfaciens var. aurantiacum

Im Verlauf der ^{3}H-DNA-Präparation von C.flaccuumfaciens var. aurantiacum wurde nach jedem Reinigungsschritt die in der Lösung verbliebene Radioaktivität durch Zählen eines Aliquots im Szintillationszähler bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tab.8: Abtrennung radioaktiv markierter Substanzen im Verlauf der Reinigung der DNA aus ^{3}H-Adenin- und ^{3}H-Thymidin-markierten Zellen von C.flaccuumfaciens var. aurantiacum.

	Markierung mit ^{3}H-Adenin		^{3}H-Thymidin	
Zellmenge	o,2 g	%	o,16 g	%
Gesamtaktivität der Zellen	1,4 x 10^{8} cpm	100	3,5 x 10^{6} cpm	100
Rohextrakt	1,4 x 10^{8}	100	3,9 x 10^{6}	111
Isopropanolfällung	7,5 x 10^{7}	54	3,2 x 10^{6}	91
CTAB-Fällung	5,8 x 10^{7}	41	3,1 x 10^{6}	89
RNase, Proteinase K Dialyse	6,8 x 10^{6}	5	1,7 x 10^{6}	49

Hierdurch wird v.a. die Abtennung der verschiedenen RNA-Spezies von der DNA veranschaulicht: Während sich die Thymidinmarkierung ausschließlich in der DNA befindet, werden mit Adenin auch t-RNA, m-RNA und r-RNA markiert; bei der Gesamtaktivität sind neben den Nukleinsäuren auch die in der Zelle vorliegenden A- bzw. T-Nukleoside sowie Nukleosidphosphate und deren weitere Verbindungen erfaßt. Daraus erklärt sich der ca. 3o-fache Radioaktivitätsgehalt (auf die Zellausbeute bezogen) der Adenin-markierten gegenüber den Thymidin-markierten Zellen.

Die Isopropanolfällung entfernt ca. 5o % des markierten Adenins in Form von löslicher RNA, kurzen DNA- und RNA-Bruchstücken sowie Adenin bzw. Adenosin(-Phosphaten). Während sich die Radioaktivität der Thymidin-markierten DNA-Präparation durch die CTAB-Fällung kaum vermindert (4 %), weist die Abnahme der Aktivität in der ^{3}H-Adenin-DNA-Präparation um 23 % auf

teilweise Entfernung von rRNA hin. Erst nachdem die Präparationen durch RNase-Behandlung und Dialyse vollständig von RNA befreit sind, liegen ihre Aktivitäten in derselben Größenordnung, d.h. bei n x 10^6 cpm/Gesamtvolumen der Präparation.

4. Charakterisierung der DNA-Präparationen

4.1. Reinheitskrontrolle der hochmolekularen DNA

Der RNA-Gehalt der DNA-Präparation wurde an Stichproben über die Orcinol-Methode (Dische, 1955) bestimmt. DNA selbst liefert in diesem Test 12-18 % der Farbreaktion einer entsprechenden RNA-Lösung. Deshalb wurde bei der Berechnung der RNA-Konzentration der Reaktionsanteil der DNA mit einem Mittelwert von 15 % berücksichtigt. Dementsprechend sollten die untersuchten DNA-Präparationen einen RNA-Gehalt von 2 % aufweisen.

Protein konnte nach der Methode von Lowry (1951) in den DNA-Lösungen nicht nachgewiesen werden.

Das UV-Spektrum lieferte die von Marmur (1961) angegebenen Absorptionsverhältnisse reiner DNA-Lösungen von 26o : 23o : 28o nm = 1,oo : o,45 : o,52. Das Verhältnis 26o : 28o betrug niemals über 1,9o, was nach Harbitz und Øyen (1974) Verunreinigung durch RNA anzeigen würde.

4.2. Molekulargewicht von fragmentierter und hochmolekularer DNA

Das Molekulargewicht doppelsträngiger, fragmentierter ^{3}H-DNA wurde in ausgewählten Fällen (*A.terregens*,

B.insectiphilum, C.michiganense, M.lacticum und M.liquefaciens) mittels PAA-Plattengelelektrophorese bestimmt (Abb.8).

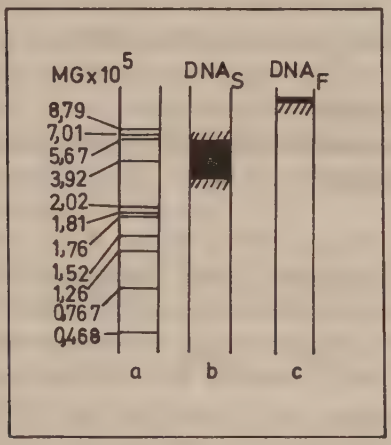


Abb.8:

PAA-Gelelektrophorese ausgewählter DNA-Präparationen

a) Hae III-Fragmente von ØX 174
b) fragmentierte ^{3}H-DNA von A.terregens, B.insectiphilum, C.michiganense, M.lacticum und M.liquefaciens
c) hochmolekulare DNA von Ag.ramosus, C.michiganense und M.lacticum.

(Die verschiedenen Proben von b) und c) lieferten jeweils dasselbe Ergebnis.)

Für alle untersuchten Präparationen ergaben sich einheitlich Werte von 3 bis 6 x 10^5 dlt. Das bedeutet, daß - bei dem durchschnittlichen MG eines Nukleotids von 3oo dlt - die ^{3}H-DNA-Einzelstränge, die in den Hybridisierungsansätzen vorlagen, aus 5oo bis 1ooo Nukleotiden bestanden.

Daneben wurden auch drei Proben unmarkierter, langkettiger DNA (aus den Stämmen Ag.ramosus, C.michiganense und M.lacticum) in die MG-Bestimmungen mit einbezogen. Da die Moleküle dieser Präparationen jedoch wesentlich größer als das längste Fragment der Referenz-DNA waren, konnte ihr MG durch Extrapolation nur annähernd auf 10^6 bis 10^7 dlt bestimmt werden.

5. DNA/DNA-Hybridisierungen

5.1. Theoretische Überlegungen zur DNA/DNA-Hybridisierung

5.1.1. Reaktionsmechanismus

Die Renaturierung von DNA in Lösung folgt einer Kinetik 2. Ordnung. Nach Wetmur und Davidson (1968) läuft die Reaktion folgendermaßen ab: Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt stellt der erfolgreiche Zusammenstoß zweier Moleküle dar, die sog. Nukleation. Dabei kommt es zur Bildung einer oder weniger korrekter Basenpaarungen zwischen den beiden Strängen am Nukleationspunkt. Die aufeinanderfolgende Paarung der übrigen Basen läuft dann schnell ab ("Reißverschlußreaktion"). Andernfalls ergäbe sich eine Kinetik 1. Ordnung.

Ist einer der beiden reassoziierenden Stränge an eine feste Basis adsorbiert, wie bei Hybridisierungen mit filtergebundener DNA, wird die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber der Renaturierung in Lösung etwa um das Zehnfache reduziert (Flavell et al., 1974a). Der fixierte Einzelstrang hat jedoch immer noch genügend Bewegungsfreiheit, um seine hochspezifischen Wechselwirkungen mit den DNA- oder RNA-Strängen in Lösung einzugehen (McCarthy und McConaughy, 1968).

Zu berücksichtigen ist dabei, daß in einem derartigen System zwei miteinander konkurrierende Reaktionen ablaufen (Flavell et al., 1974a). Neben der Hybridisierung der filtergebundenen DNA (DNA_F) mit der in Lösung befindlichen, radioaktiv markierten DNA (DNA_S) findet auch eine Renaturierung der DNA_S

entsprechend $\frac{-d[DNA_S]}{dt} = k_1 [DNA_F][DNA_S] + k_2 [DNA_S]^2$ statt.

Letztere ist jedoch zu vernachlässigen, wenn die Konzentration von DNA_F "unendlich" hoch ist.

Bei einem großen Überschuß der DNA_F gegenüber DNA_S wird aber die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr von der Nukleation kontrolliert. Die Geschwindigkeit der Hybridisierung ist dann nämlich so groß, daß die Umgebung des Filters an DNA verarmt. Die Diffusion der DNA_S zum Filter wird somit zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt:

$$\frac{-d[DNA_S]}{dt} = J + k_2 [DNA_S]^2 ;$$

$$0 < J < k_1 [DNA_F] [DNA_S] ;$$

Dabei ist die Größe des Diffusionsterms J abhängig vom Diffusionskoeffizienten der DNA_S und dem Konzentrationsgradienten.

Die der Hybridisierung parallel laufende Renaturierung der DNA_S bringt zwei unerwünschte Effekte mit sich: Durch Bildung vollständiger Duplices werden die Einzelstränge der Hybridisierung entzogen. Es entstehen aber auch unvollständige Duplices mit ungepaarten Enden, die lang genug sind, um diese Struktur an die DNA_F zu binden. Bei niedriger DNA-Homologie ist aufgrund schlechter Basenpaarungen die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber dem homologen System herabgesetzt. Dadurch wirkt sich die Renaturierung stärker aus, d.h. für die heterologe DNA_F steht bei gleichem Einsatz weniger DNA_S zur Verfügung als für die homologe DNA_F, was zur Unterschätzung der Homologie führen kann. Andererseits wird mehr DNA in Form unvollständiger Duplices gebunden und kann somit eine Überschätzung der Homologie bewirken.

Eine sinnvolle Korrektur dieser Effekte ist aufgrund der vorliegenden Meßdaten nicht möglich. Durch Anwendung eines kleinen Reaktionsvolumens, ausreichende Fragmentierung und geringe Konzentration der DNA_S kann jedoch der Anteil der Renaturierung an der Gesamtreaktion so stark zurückgedrängt werden, daß er bei der Auswertung der Hybridisierungsergebnisse nicht berücksichtigt werden muß (Flavell et al., 1974 b).

5.1.2. Beeinflussung des Reaktionsablaufs durch verschiedene Parameter

Bei der Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen für Nukleinsäurehomologie-Untersuchungen in einem bestimmten System sind folgende Parameter zu berücksichtigen:

5.1.2.1. Reaktionstemperatur

Die Reaktionstemperatur muß hoch genug gewählt werden, um Sekundärstrukturbildungen innerhalb eines Stranges zu schwächen (Britten und Kohne, 1968) und die Bildung unspezifischer Bindungen zwischen den Einzelsträngen einzuschränken. Marmur et al. (1963b) ermittelten als optimale Hybridisierungstemperatur in diesem Sinne 25°C unter dem T_m der untersuchten Nukleinsäurespezies.

Bei 2o bis 3o° unter T_m liegt auch das Maximum der Renaturierungsgeschwindigkeit. Werden niedrigere Hybridisierungstemperaturen angewendet, sind unspezifische Basenpaarungen über kurze Strecken möglich, die auch zu intramolekularen Ringbildungen führen, und so die Reaktion hemmen können (Wetmur und Davidson, 1968).

Schließlich erleichtert unter diffusionskontrollierten Hybridisierungsbedingungen hohe Versuchstemperatur den Transport der DNA_S zum Filter und steigert somit die Hybridisierungsrate (Flavell et al., 1974a). Allerdings ist zu beachten, daß mit der Erhöhung der Hybridisierungstemperatur die Wahrscheinlichkeit zunimmt, daß die DNA_F vom Filter desorbiert. Bonner et al. (1967) beobachteten in Versuchsansätzen, die 2o h bei 66°C inkubiert worden waren, Ablösung von 28 bis 41 % der filtergebundenen DNA.

5.1.2.2. Ionenstärke

Für die Abhängigkeit der thermischen Stabilität eines DNA-Moleküls (T_m) von der Na^+-Molarität des Lösungsmittels (M), unter Berücksichtigung des G+C-Gehalts der betreffenden DNA-Spezies, stellten Schildkraut und Lifson (1965) folgende Gleichung auf:

$$T_m = \frac{\% \text{ G+C}}{2,44} + 81,5 + 16,6 \log M.$$

Das bedeutet, daß sich eine Erhöhung des Na^+-Gehalts der DNA-Lösung stabilisierend auf die Doppelhelixstruktur auswirkt. Dieser Einfluß der Na^+-Konzentration beruht auf einer Veränderung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den beiden DNA-Einzelsträngen (Wetmur und Davidson, 1968). Durch die Anwendung hoher Na^+-Konzentrationen im Hybridisierungsansatz kann man somit eine relativ hohe Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion erreichen (Stackebrandt, 1977). Da dann jedoch meist auch sehr hohe Reaktionstemperaturen notwendig sind, läßt sich dieser Effekt in der Praxis nur begrenzt ausnützen (siehe oben).

5.1.2.3. Zusatz von Formamid (FA)

FA wirkt wie Dimethylsulfoxid, Harnstoff und eine Reihe anderer Amide, aliphatischer Alkohole und aromatischer Verbindungen denaturierend auf native DNA. Nach den Untersuchungen von Levine et al. (1962) beruht diese Wirkung auf folgendem Prinzip:

Die Phosphatgruppen bedingen eine hohe Dichte negativer Ladungen auf der Außenseite der DNA-Duplex. Innerhalb der Doppelstranghelix werden die relativ unpolaren Basen durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten. Wenn bei der Denaturierung die beiden Stränge getrennt werden, nimmt die räumliche Dichte der negativen Ladungen ab und die hydrophoben Basen werden dem Solvens exponiert. Setzt man nun die Hydrophile des Lösungsmittels durch Zusatz der geeigneten Menge eines hydrophoben Agens herab, wird die hohe Ladungsdichte der Phosphatgruppen energetisch ungünstig, während sich die freiliegenden hydrophoben Basen stabilisieren können.

Für die Abhängigkeit der denaturierenden Wirkung eines Agens von seiner Fähigkeit, Wasserstoffbrücken mit der DNA zu bilden, liegen keine Hinweise vor. Diese Aussage begründen die Autoren mit der Beobachtung, daß die denaturierende Wirkung eines Agens durch die Substitution von H-Resten durch Alkylgruppen zunimmt und offensichtlich mit der Azidität oder Basizität der untersuchten Verbindungen nicht in Zusammenhang steht.

Die Gültigkeit dieser Hypothese wird durch folgende Beobachtungen unterstützt: Entsprechend der denaturierenden Wirkung eines Solvens verhält sich die Löslichkeit von Adenin und in umgekehrter Weise auch weitgehend die von

Pyrophosphat. Ferner nimmt die Menge eines Agens, die benötigt wird, um DNA in bestimmtem Ausmaß zu denaturieren, linear mit der Na^+-Konzentration der Lösung zu.

Die optimale Hybridisierungstemperatur von T_m-25°C liegt in Puffern von geeigneter Ionenstärke je nach dem G+C-Gehalt der DNA oft über 65°C. In diesem Temperaturbereich löst sich die filtergebundene DNA in signifikanten Mengen von der Membran ab (siehe oben); außerdem kommt es zu Einzelstrangbrüchen und zur Zerstörung von N-glycosidischen Bindungen innerhalb der DNA (Marmur et al., 1963b). Diese Effekte können durch Zusatz denaturierender Agentien zum Reaktionsgemisch vermieden werden, da damit der Schmelzpunkt der Duplices und somit die optimale Hybridisierungstemperatur herabgesetzt wird.

Das gebräuchlichste Agens, das zu diesem Zweck eingesetzt wird, ist FA. Pro Volumenprozent FA in der DNA-Lösung wird der T_m nativer DNA und auch filtergebundener (Hetero-) Duplices um o,72°C herabgesetzt. Diese Abhängigkeit wurde auch bei unterschiedlichen Na^+-Konzentrationen der Inkubationslösungen (1 x SSC und 5 x SSC) nachgewiesen (McConaughy et al., 1969).

5.1.2.4. Viskosität

Bei Zusatz von Saccharose, Glycerin, $NaClO_4$ oder auch FA zum Lösungsmittel, wird die Reassoziierungsgeschwindigkeit zweier DNA-Stränge in direkter Abhängigkeit von der Viskosität der Lösung vermindert. Dies gilt sowohl für Komponenten, die einen starken Einfluß auf den Schmelzpunkt der Duplex haben (z.B. $NaClO_4$), als auch für solche, die sich auf den T_m kaum auswirken (z.B. Saccharose). Dabei erweist sich die Abhängigkeit von der Viskosität des Solvens umso größer,

je geringer dessen Na^+-Konzentration ist (Wetmur und Davidson, 1968). Die optimalen Reaktionsbedingungen bezüglich FA-Gehalt und Na^+-Konzentration der Inkubationslösung müssen deshalb bei der entsprechenden Temperatur für DNA-Spezies mit unterschiedlichem G+C-Gehalt jeweils experimentell ermittelt werden.

5.1.2.5. Molekulargewicht der DNA_S

Wetmur und Davidson (1968) beobachteten, daß die Geschwindigkeit der DNA-Renaturierung in Lösung proportional zur Quadratwurzel der Stranglänge abnimmt (bei gleicher DNA-Phosphat-Konzentration der Proben mit unterschiedlichem Molekulargewicht). Die Tatsache, daß sich keine lineare Proportionalität ergibt, führen die Autoren auf den "Ausschlußvolumeneffekt" zurück. Das bedeutet, je länger ein DNA-Strang ist (der in Lösung unregelmäßig kondensierte Tertiärstrukturen ausbildet), desto schwieriger ist es für einen zweiten Strang, in ihn einzudringen und komplementäre Stellen zu finden, d.h. nicht alle möglichen Nukleationspunkte sind gleich gut zugänglich. Bei der nukleationskontrollierten Hybridisierung, bei der dieselbe Abhängigkeit zu erwarten wäre, konnten jedoch Flavell et al. (1974a) keinen Zusammenhang zwischen Molekulargewicht der DNA_S und Reaktionsgeschwindigkeit feststellen. Die Ursache dafür ist in sterischen Effekten der Filterfixierung zu suchen.

Im Gegensatz dazu liegt bei der diffusionskontrollierten Hybridisierung umgekehrte Proportionalität der Reaktionsgeschwindigkeit zum Molekulargewicht der DNA_S vor. Je kleiner ihre Fragmente sind, desto mehr wird außerdem die Renaturierung gegenüber der Hybridisierung zurückgedrängt.

Allerdings ist für die Spezifität und Stabilität der Hybride eine bestimmte Mindestlänge der Einzelstränge erforderlich. Erst von 25-5o Nukleotiden an aufwärts, d.h. bei einem Molekulargewicht von mindestens 8-15 x 10^3 dlt (in Abhängigkeit vom G+C-Gehalt) entstehen Hybride gleichmäßiger thermischer Stabilität (Kennell, 1971).

Um reproduzierbare Bedingungen zu erhalten, bewährt es sich, das Molekulargewicht der DNA_S durch Fragmentierung mit der Frenchpress zu kontrollieren (Britten und Kohne, 1968). Dabei müssen nach Britten et al. (1974) folgende Parameter konstant gehalten werden: Form des Austrittsventils, Durchtrittsgeschwindigkeit und Salzkonzentration der Nukleinsäurelösung. Die DNA-Konzentration scheint weitgehend ohne Einfluß auf die Fragmentgröße zu sein (siehe auch C.4.2.).

5.1.2.6. DNA-Konzentration

Aus der Gleichung

$$\frac{-d[DNA_S]}{dt} = k_1 [DNA_F] [DNA_S] + k_2 [DNA_S]^2 \quad \text{(Flavell et al., 1974a)}$$

kann abgeleitet werden, daß die Reaktionsgeschwindigkeit sowohl zu $[DNA_S]$ als auch zu $[DNA_F]$ proportional ist. Ein Überschuß an DNA_F begünstigt die Hybridisierung gegenüber der unerwünschten Renaturierung. Dabei hängt die Hybridisierungsrate jedoch nur etwa bis zu einem Verhältnis von DNA_F : DNA_S = lo : 1 linear von der Menge der filtergebundenen DNA ab; bei größerem DNA_F-Überschuß ist die Auswirkung geringer (McCarthy und McConaughy, 1968).

5.2. Untersuchungen zu den Reaktionsbedingungen der DNA/DNA-Hybridisierungen

5.2.1. Na^+- und FA-Konzentration

Der G+C-Gehalt der untersuchten DNA-Spezies liegt mit durchschnittlich 74 % so hoch, daß für die Auswahl geeigneter Na^+- und FA-Konzentrationen kein allzu großer Spielraum gegeben ist. Eine hohe Na^+-Konzentration wirkt sich zwar positiv auf die Hybridisierungsrate aus, jedoch muß man dann, um bei einer optimalen Hybridisierungstemperatur von T_m - 25°C die Reaktionstemperatur von 66°C nicht zu überschreiten (vgl.C.5.2.), mit beträchtlichem FA-Zusatz arbeiten. Dies führt über die Viskositätserhöhung im Reaktionsgemisch wiederum zu einer Verminderung der Hybridisierungsrate. Aus diesem Grund betrugen in den vorliegenden Untersuchungen die Bindungen der DNA_S an die homologe DNA_F nur 15 bis 25 %, während z.B. bei Pediokokken (G+C = 39 %) 48 % Bindung erreicht wurden (Back und Stackebrandt, 1978).

Für die in Tabelle 9 aufgeführten Bedingungen wurden die Reaktionskinetiken ermittelt:

Tab.9: Variierung der Parameter: Ionenstärke, FA-Konzentration und Hybridisierungstemperatur (Versuchsbedingungen 1) bis 4) in den durchgeführten Reaktionskinetiken (Tab.9 und Abb.7)

Versuchs-bedin-gungen	Ionen-stärke	T_m	T_m-25°C	FA-Kon-zentra-tion	Hybridisierungs-temperatur
1)	6xSSC	113°C	88°C	5o %	52°C
2)	6xSSC			3o %	66°C
3)	3xSSC	1o8°C	83°C	5o %	47°C
4)	3xSSC			3o %	6o°C

Dabei wurden jeweils o,5 µg ^{3}H-DNA von C.oortii mit je 17,2 µg homologer DNA_F oder 16,9 µg DNA_F von C.bovis zur Reaktion gebracht (Tab.1o, Abb.9).

Tab.1o: Kinetik der DNA/DNA-Hybridisierung bei unterschiedlichen Na^+- und FA-Konzentrationen.
(Die Versuchsbedingungen 1) bis 4) sind in Tabelle 9 aufgeführt)

Reaktionsdauer [h]	% Bindung von ^{3}H-$DNA_{C.oortii}$ an							
	DNA_F C.oortii				DNA_F C.bovis			
	Versuchsbedingungen				Versuchsbedingungen			
	1)	2)	3)	4)	1)	2)	3)	4)
3				3				
6	9		13	14	2,3		1,5	
12				27				
18				31				
19	3o	6	28		3,8	o,8	3,o	2,8
24	33	6	3o	31	4,2	o,8	4,3	4,o
3o	37		3o	3o	3,8		4,o	3,5
36				29				
5o	38	1o	3o		5,o	o	6,8	5,3
6o				32				
	% Homologie (3o h) :				1o.2		13.3	11.8

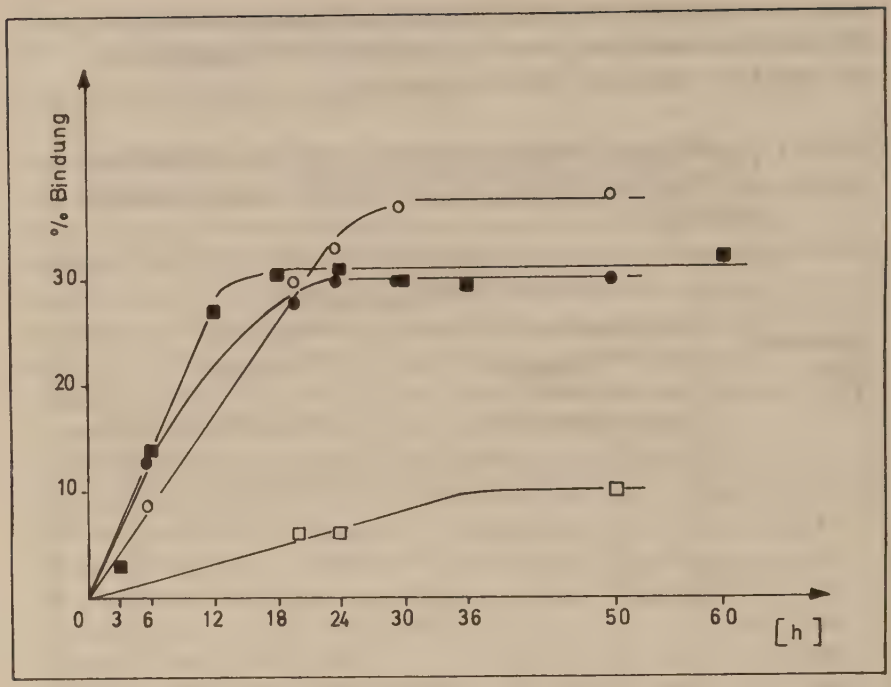


Abb.9:

Hybridisierungskinetik im homologen System von C.oortii
Die in Tab.9 angegebenen Versuchsbedingungen sind mit folgenden Symbolen bezeichnet: 1) o-o, 2) □ - □ , 3) ●-●, 4) ■ - ■ .

Abb.9 stellt den Reaktionsverlauf unter den Bedingungen 1) bis 4) (Tab.9) im homologen System dar. In 6 x SSC/5o % FA bei 52°C wird dabei die höchste prozentuale Bindung (38 %) erreicht, die Hybridisierungsreaktion ist jedoch erst nach ca. 3o h vollständig abgelaufen. Die niedrige Reaktionsgeschwindigkeit ist in diesem Fall auf die hohe Viskosität des Hybridisierungsmediums zurückzuführen. Die Bedingungen

3 x SSC/5o % FA, 47°C und 3 x SSC/3o % FA, 6o°C liefern jeweils dieselben Bindungswerte (29-3o %), die Bildung der Duplices ist jedoch in 3o % FA bei 6o°C früher beendet als in dem Puffer mit höherer Viskosität. In 6 x SSC/3o % FA bei 66°C werden nach 5o h Reaktionsdauer nur lo % Bindung erreicht. Die quantitative Bestimmung der DNA-Menge, die zu den verschiedenen Zeitpunkten der Probennahme noch an die jeweiligen Filter gebunden war, ergab, daß sich nach 24 h bereits 5o % der DNA_F abgelöst hatten. Diese Versuchsbedingungen sind demnach für die Praxis nicht anwendbar.

Um die Spezifität der verschiedenen Versuchsansätze beurteilen zu können, wurden unter allen Reaktionsbedingungen auch Filter des heterologen C.bovis mitgeführt. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Homologiewerte für die Versuchsbedingungen 1), 3) und 4) (Tab.lo). Bei der Reaktion in 6 x SSC/3o % FA bei 66°C war dieselbe Erscheinung zu beobachten, wie im homologen System. - Somit kann angenommen werden, daß die Versuchsbedingungen 1), 3) und 4) bezüglich ihrer Spezifität gleichwertig sind.

Obwohl in 6 x SSC (5o % FA, 52°C) die höchste prozentuale Bindung erreicht werden konnte, wurden die Homologieuntersuchungen in 3 x SSC durchgeführt, und zwar alternativ mit 5o % FA bei 47°C und mit 3o % FA bei 6o°C über 24 bis 36 h. Da in 6 x SSC eine längere Hybridisierungsdauer notwendig ist, ist hier die Wahrscheinlichkeit größer, daß sich - auch bei "nichtkritischen" Temperaturen - die hochmolekulare DNA bzw. die bereits gebildeten Hybride vom Filter ablösen.

Die Äquivalenz der beiden ausgewählten Versuchsbedingungen bezüglich ihrer Spezifität wird in Tab.11 anhand der Hybridisierung von drei Stämmen C.michiganense und dem dazu heterologen Ag.ramosus veranschaulicht.

Tab.11: % DNA-Homologie von C.michiganense DSM 2o134, ATCC 445o, ATCC 7429 und Ag.ramosus.
a) in 3 x SSC/5o % FA bei 47°C
b) in 3 x SSC/3o % FA bei 6o°C

DNA_S / DNA_F	2o134		445o		7429		Ag.ramosus	
	a)	b)	a)	b)	a)	b)	a)	b)
2o134	loo	loo	95	94	96	93	12	14
7429	97	loo	95	96	loo	loo	13	14
Ag.ramosus	13	13	15	15	11	13	loo	loo

5.212 Konzentration der DNA_S

Die Abhängigkeit des Hybridisierungsverlaufs von der ^3H-DNA-Konzentration wurde am Beispiel von C.oortii untersucht. Wie Abb.lo zeigt, ergeben sich bei Einsatz von o,1, o,5 bzw. 1,o µg DNA_S kaum Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit. Ein Vergleich der prozentualen Bindungen läßt die Tendenz erkennen, daß bei Einsatz höherer Konzentrationen DNA_S die Hybridisierungsreaktion DNA_F x DNA_S - zugunsten der Renaturierung DNA_S x DNA_S - abnimmt.

Bei den vorliegenden Homologieuntersuchungen wurden, aufgrund der unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten der ^3H-DNA-Präparationen, zwischen o,1 und 1,o µg DNA_S pro Filter eingesetzt. Abb. lo zeigt, daß dabei jeweils mit derselben Hybridisierungsdauer gerechnet werden kann. Eine Berücksichtigung der unterschiedlichen prozentualen Bindung - die durch die verschiedenen DNA_S-Konzentrationen bedingt wird - ist nicht notwendig, da die Berechnung der

Homologiewerte jeweils vergleichend innerhalb einer ^{3}H-DNA-Spezies vorgenommen wurde (siehe B.11.4.).

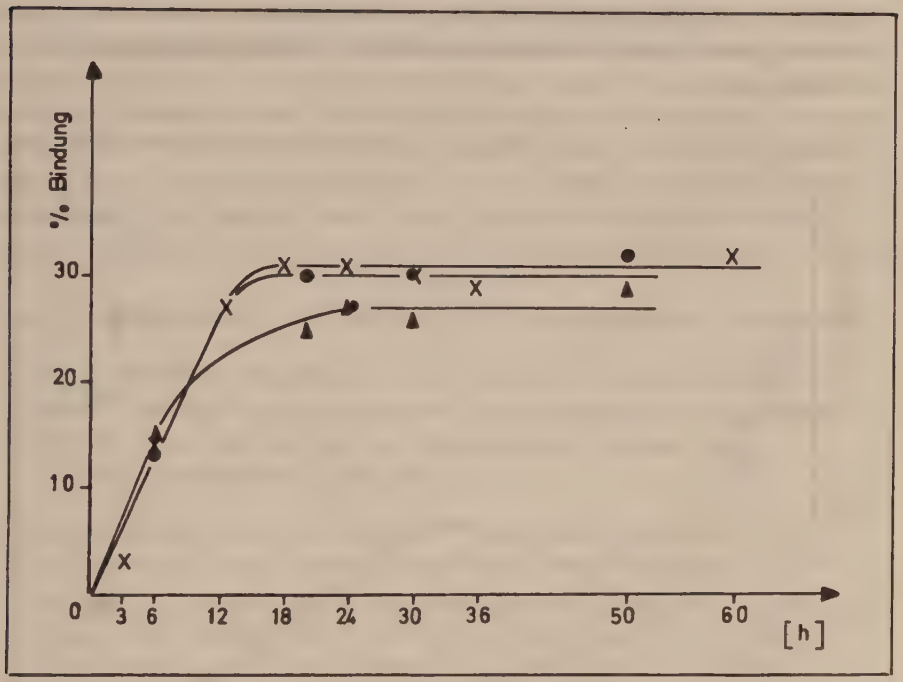


Abb.1o:

Hybridisierungskinetik im homologen System von C.oortii in Abhängigkeit von der DNA_S-Konzentration:

●-●: o,1 µg DNA_S/Ansatz, x-x: o,5 µg DNA_S/Ansatz,
▲-▲: 1,o µg DNA_S/Ansatz.

Die eingesetzte Menge DNA_F betrug in allen Fällen 15,6 µg/Ansatz. Versuchsbedingungen: 3 x SSC/3o % FA, 6o°C.

5.2.3. Menge der DNA_F

Der Einfluß der pro Hybridisierungsansatz vorliegenden DNA_F-Menge bzw. des Verhältnisses DNA_F : DNA_S auf das Ausmaß der Hybridbildung wurde im homologen System von C.michiganense untersucht.

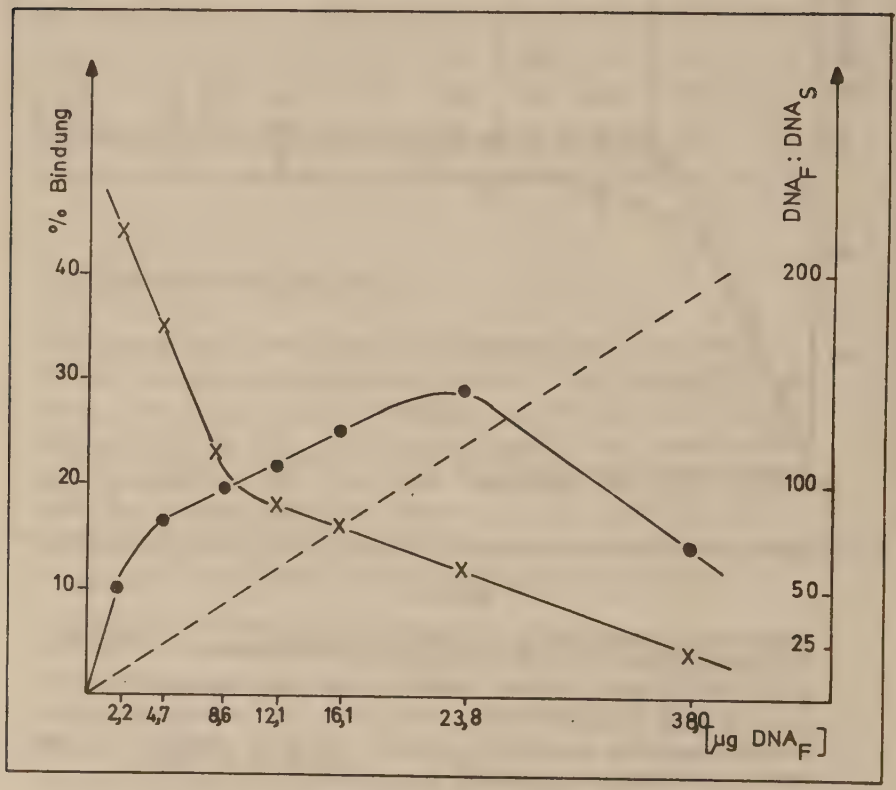


Abb.11:

Abhängigkeit der prozentualen Bindung von der DNA_F-Menge im homologen System von C.michiganense

●-●: % Bindung pro eingesetzte Menge DNA_F (= absolute Bindung)
x-x: % Bindung bezogen auf 1o µg DNA_F
---: Verhältnis DNA_F : DNA_S

Die eingesetzte Menge DNA_S betrug in allen Fällen o,2 µg/Ansatz.
Versuchsbedingungen: 3xSSC/3o% FA, 6o°C. Versuchsdauer: 24 h.

Wie Abb.11 zeigt, ist die prozentuale Bindung der ^{3}H-DNA an die DNA_F bis zu einem Verhältnis von DNA_F : DNA_S = 25 in wesentlich stärkerem Maße von der DNA_F-Menge abhängig als bei 25 < DNA_F : DNA_S < 120. Eine ähnliche Erscheinung beschreiben McCarthy und McConaughy (1968) bereits ab einem Verhältnis DNA_F : DNA_S = 10 (siehe C.5.1.2.6.). Bei sehr hohen DNA_F-Mengen nimmt die prozentuale Bindung wieder ab. Betrachtet man die DNA_S-Menge, die an jeweils den gleichen Betrag DNA_F bindet (hier: 10 µg DNA_F), so stellt man im gesamten Testbereich eine Abnahme der Bindung mit zunehmender DNA_F-Menge fest. Dabei tritt die Änderung des Proportionalitätsfaktors erst bei einem Verhältnis DNA_F : DNA_S = 50 ein.

Diese Beobachtungen sind vermutlich folgendermaßen zu erklären:

1. Bei niedrigen DNA_F-Mengen sind die DNA-Stränge auf dem Filter sterisch gut zugänglich. Die Erhöhung der DNA_F-Menge bewirkt eine Steigerung der prozentualen Bindung (bei gleicher Konzentration von DNA_S).

2. Dieser Effekt schwächt sich mit steigender DNA_F-Menge ab, bis schließlich die absolute Bindung wieder abnimmt, weil die DNA auf den Filtern so dicht gelagert ist, daß die Anbindung der markierten DNA sterisch behindert wird. Diese "Überladung" der Filter äußert sich bereits beim Beladevorgang durch die erschwerte Filtration der DNA-Lösung - trotz maximal möglich angelegtem Vakuum.

In den vorliegenden Homologieuntersuchungen wurden Filter mit einem DNA-Gehalt zwischen 9 und 25 µg verwendet. Dabei schwankt das Verhältnis DNA_F : DNA_S bei einem Einsatz von durchschnittlich 0,5 µg DNA_S zwischen 18 : 1 und 50 : 1. Bis zu einem 50-fachen DNA_F-Überschuß ist die prozentuale Bindung pro 10 µg DNA_F der tatsächlich vorliegenden DNA_F-Menge direkt

proportional. Betrachtet man die absolute Bindung, ändert sich dagegen der Faktor dieser Abhängigkeit innerhalb der Schwankungsbreite von DNA_F : DNA_S, die bei der praktischen Durchführung der Hybridiserungen vorlag. Demzufolge ist eine sinnvolle Korrektur der erhaltenen Bindungswerte, unter Berücksichtigung der absoluten DNA_F-Menge, nur möglich, wenn man die prozentuale Bindung auf eine jeweils konstante Menge DNA_F umrechnet (siehe B.11.4.).

5.3. DNA/DNA-Hybridisierungen bei coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe B

Wie bereits in der Einleitung erläutert, wurden zunächst detaillierte DNA-Homologieuntersuchungen innerhalb der Gruppen mit demselben Mureintyp durchgeführt. DNA/DNA-Hybridisierungen zwischen Organismen mit verschiedener Murein-Primärstruktur wurden sodann anhand einiger ausgewählter Vertreter der Gruppen I bis VI vorgenommen.

5.3.1. Gruppe I, Mureintyp [L-Lys] D-Glu - Gly - L-Lys

In Tabelle 12 sind die DNA-Homologiewerte der Organismen aus Gruppe I aufgeführt. Das Molkereiabwasser-Isolat E 36/1 ist zu M.lacticum loo % homolog. Zu diesen beiden Stämmen zeigt C. laevaniformans DNA-Homologie um 4o %.

Tab.12: % DNA-Homologie bei den Vertretern der Gruppe I

DNA_F \ DNA_S	M. lacticum	E 36 /1	C.laevani formans
M.lacticum	loo	lol	42
C.laevaniformans	44	37	loo

5.3.2. Gruppe IV, Mureintyp [L-Hsr] D-Glu - D-Orn

Wie Tabelle 13 zeigt, sind alle Organismen der Gruppe IV untereinander sehr hoch verwandt. Es lassen sich zwei Gruppierungen erkennen:

C.betae, C. flaccuumfaciens, C. flaccuumfaciens var. aurantiacum, C. oortii und C. poinsettiae weisen untereinander 7o bis loo % DNA-Homologie auf. C. flaccuumfaciens und C.flaccuumfaciens var. aurantiacum sowie C. flaccuumfaciens var. aurantiacum und C. poinsettiae sind praktisch zu loo % homolog, während C. flaccuumfaciens und C. poinsettiae nur etwa 8o % der homologen Bindung zeigen. Dies weist darauf hin, daß unter den angewandten Versuchsbedingungen innerhalb des Homologiebereichs von 7o bis loo % keine genaue Differenzierung möglich ist.

Dagegen zeigen B.citreum, B.luteum und B.pusillum untereinander und zu den als Corynebacterium klassifizierten Vertretern der Gruppe I Homologiewerte um 5o %.

Tab.13: % DNA-Homologie bei den Vertretern der Gruppe IV.

DNA_F \ DNA_S	C.betae	C.flaccuumfaciens	C.flaccuumfaciens aurantiacum	C.oortii	C.poinsettiae	B.citreum	B.luteum	B.pusillum
C.betae	loo	73	8o	74	8o	51	56	51
C.flaccuumfaciens	77	loo	lo2	78	83	48	45	54
C.flaccuumfaciens var.aurantiacum	73	lo4	loo	82	99	48	51	49
C.oortii	79	71	81	loo	71	51	5o	54
C.poinsettiae	75	8o	99	78	loo	46	45	5o
B.citreum	48		56	52	47	loo	44	53
B.luteum						51	loo	49
B.pusillum	5o		54	5o	51	52	48	loo

5.3.3. Gruppe V, Mureintyp [L-Hsr] D-Glu - Gly - D-Orn

In der Gruppe V befinden sich neben definierten Sammlungsstämmen auch zwei Eigenisolate aus Molkereiabwasser, S 11o und E 37/4. Aus Tab.14 ist zu ersehen, daß sich die Homologiewerte hier hauptsächlich im Bereich zwischen 2o und 4o % bewegen.

Tab.14: % DNA-Homologie bei den Vertretern der Gruppe V.

DNA_F \ DNA_S	C.barkeri	S 11o	B.albidum	B.saperdae	B.insectiphilum	M.liquefaciens	DSM 2o143	A.terregens	E 37/4	B.testaceum
C.barkeri	1oo	18	2o	23	23	21	23	17		23
S 11o		1oo				18	21	22		
B.albidum			1oo	37			36			
B.saperdae			34	1oo			39			
B.insectiphilum	22	18	21	25	1oo	28	32	18		21
M.liquefaciens	21	2o			3o	1oo	32	2o		22
DSM 2o143	22				27		1oo			18
A.terregens	18	23	16	16	18	23	22	1oo	26	24
E 37/4		22			23			25	1oo	59
B.testaceum	22	19	17	18	21	21	21	24	57	1oo

Hohe Ähnlichkeit (58 % DNA-Homologie) zeigt der Stamm E 37/4 zu B.testaceum. A.terregens, der einzige bekannte "Arthrobacter" mit Murein der Gruppe B, ist zu diesen beiden Organismen geringfügig höher verwandt als zum Rest der Gruppe (24 bis 26 % gegenüber 16 bis 23 %).

Als näher verwandte Gruppierung läßt sich außerdem noch erkennen: B.albidum, B.saperdae, B.insectiphilum, M.liquefaciens und der coryneforme Organismus DSM 2o143. Diese fünf Stämme zeichnen sich interessanterweise gegenüber allen anderen untersuchten B-Typ-Organismen durch den Besitz von Galactosamin als Polysaccharidkomponente der Zellwand aus (siehe C.1.2.).

Der Stamm S 11o, bei dem das Ornithin der Interpeptidbrücke teilweise durch Hydroxyornithin ersetzt ist, weist zu den anderen Mitgliedern der Gruppe V ähnlich niedrige DNA-Homologiewerte auf wie C.barkeri (17 bis 23 %). Da diese sich geringfügig über den Werten bewegen, die allgemein zwischen verschiedenen Gruppen anzutreffen sind (siehe C.5.3.5.), erscheint die Einordnung dieses Stammes in Gruppe V gerechtfertigt.

5.3.4. Gruppe VI, Mureintyp [L-DAB] D-Glu - D-DAB

Unter den Organismen der Gruppe VI sind wiederum Gruppierungen mit unterschiedlichem Ähnlichkeitsgrad festzustellen (Tab.15).

Tab.15: % DNA-Homologie bei den Vertretern der Gruppe VI

DNA_F \ DNA_S	C.insidiosum	C.michiganense	C.nebraskense	C.aquaticum	C.mediolanum	Ag.ramosus	B.helvolum
C.insidiosum	1oo	73	48	18	16	17	17
C.michiganense	74	1oo		17	14	18	12
C.sepedonicum	51	56	39	14	13	18	16
C.nebraskense	45	46	1oo	15	13	15	12
C.aquaticum	17	19	23	1oo	22	21	17
C.mediolanum	2o	16	19	22	1oo	27	21
Ag.ramosus	19	18	19	25	25	1oo	21
B.helvolum	15	14	2o	17	16	18	1oo

Die pflanzenpathogenen Spezies C.insidiosum, C.michiganense, C.sepedonicum und C.nebraskense zeigen relativ hohe DNA-Homologiewerte von 74 bis 39 %. Die übrigen Vertreter der Gruppe weisen untereinander und zu den pflanzenpathogenen Organismen niedrigere Ähnlichkeit auf. Die DNA-Homologiewerte bewegen sich hier hauptsächlich im Bereich von 1o bis 2o %.

Dabei treten C.aquaticum, C.mediolanum und Ag.ramosus - der ursprünglich nicht in die Gruppe der coryneformen Bakterien eingeordnet worden war - mit 21 bis 27 % DNA-Homologie untereinander als etwas höher verwandte Gruppe hervor.

Lediglich B.helvolum zeigt zu allen anderen Vertretern der Gruppe VI gleichmäßig niedrige Homologiewerte von 12 bis 21 %.

5.3.5.Übersicht über die DNA-Homologiewerte zwischen Organismen der Gruppen I bis VI

Tab.16 liefert einen Überblick über die DNA-Homologie zwischen Organismen der Gruppen I bis VI, die anhand einzelner ausgewählter Vertreter ermittelt wurden.

DNA-Homologie über 4o % wird - wie innerhalb der Gattungen Cellulomonas und Arthrobacter - nur bei Stämmen mit identischem Mureintyp gefunden. Allgemein treten zwischen Organismen mit unterschiedlicher Murein-Primärstruktur Homologiewerte von 1o bis 2o % auf, die jedoch auch bei Vertretern desselben Mureintyps vorkommen können (Gruppe VI). Zwischen den Gruppen I, II und V bewegt sich die DNA-Homologie jedoch über diesem Niveau (18 bis 34 %). C.bovis, der einzige Vertreter der Gruppe III, zeigt zu allen anderen untersuchten coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe B lediglich 8 bis 16 % DNA-Homologie. Nur geringfügig niedrigere Homologiewerte (7 bis 13 %) wurden zwischen B-Typ-Organismen und ver-

schiedenen Cellulomonas-Stämmen gemessen, die als Vertreter mit Mureinen der Gruppe A zum Vergleich in die DNA/DNA-Hybridisierungen mit einbezogen wurden.

Tab.16: % DNA-Homologie zwischen den Gruppen I bis VI und zwischen einzelnen Vertretern dieser Gruppen und verschiedenen Cellulomonas-Arten. Zusammenfassung der Ergebnisse aus 14 getrennt durchgeführten Hybridisierungsversuchen (38o Werte)

Gruppe	I	II	V	IV	VI	III
I	37 - 1oo					
II	29 - 34	1oo				
V	18 - 33	19 - 25	16 -1oo			
IV	9 - 2o	15 - 2o	1o - 2o	44 -1oo		
VI	9 - 19	13 - 21	1o - 2o	11 - 22	12 -1oo	
III	8 - 13	11 - 12	11 - 15	11 - 13	1o - 16	1oo
Cellulomonas uda			13 (2 Werte)			
Cellulomonas fimi			9 - 11 (4 Werte)			
Cellulomonas cellasea			7 - 11 (24 Werte)			

6. Schmelzpunktbestimmung der DNA/DNA-Hybride

6.1. Theoretische Betrachtungen zur thermischen Stabilität von Nukleinsäure-Hybriden

Neben dem Ausmaß der Hybridbildung zwischen zwei DNA-Spezies ist auch die thermische Stabilität der entstandenen Duplices ein Maß für den Verwandtschaftsgrad der betreffenden Organismen.

In Abhängigkeit von der Ionenstärke der Inkubationslösung und der Basenzusammensetzung der DNA gibt die Dissoziationstemperatur der Hybride Aufschluß über den vorliegenden Grad der Basenpaarung.

6.1.1. Definition des $T_{m(e)}$

Der Schmelzpunkt der filtergebundenen Duplices, der durch Eluieren der radioaktiven DNA bestimmt wird ($T_{m(e)}$), liegt um einige Grade höher als der über die UV-Absorptionsänderung in Lösung bestimmte T_m (bei gleicher Na^+- und FA-Konzentration). Denn die Änderung der Absorption beginnt bereits, wenn sich die Helixstruktur auflockert, die beiden Stränge aber noch an GC-reichen Stellen zusammengehalten werden. Die vom Filter eluierte DNA dagegen wird erst nach vollständiger, irreversibler Denaturierung erfaßt (Bezeichnung auch als $T_{m(i)}$). Dieser Effekt kann jedoch weitgehend durch die Fragmentierung der verwendeten ^3H-DNA kompensiert werden, da sich auch die Länge der Duplices auf die Dissoziationstemperatur auswirkt (McCarthy und McConaughy, 1968). Allerdings ist ab einer Stranglänge von 5o bis loo Nukleotiden nur noch eine schwache Zunahme der thermischen Stabilität festzustellen (Laird et al., 1969).

6.1.2. Abhängigkeit des $T_{m(e)}$ von der Art der Helixstruktur

Die Abhängigkeit des $T_{m(e)}$ vom Anteil ungepaarter Basen in der Duplex kann mithilfe synthetischer Polynukleotidstränge (z.B. poly dA_n/poly $dT_{(n-x)}G,C_x$) untersucht werden oder durch chemische Veränderung einzelner Basen (z.B. durch salpetrige Säure) in DNA natürlicher Herkunft. Die auf diese Weise ermittelten Werte schwanken von $o,5^o$ bis $1,6^o$ $\Delta T_{m(e)}$ pro 1 % ungepaarter Basen (Kotaka und Baldwin, 1964; Moore und McCarthy, 1969; Laird et al., 1969; Brenner et al., 1972a; De Ley et al., 1973), jedoch dürfte die Beziehung $1^o \Delta T_{m(e)}/1\%$ Fehlpaarung einen verläßlichen Kompromiß darstellen (Bonner

et al., 1973). Weniger als 1 % Sequenzunterschied sind mithilfe des $T_{m(e)}$ nicht mehr zu erfassen (McCarthy und Church, 197o); liegen mehr als 15-25 % der Basen ungepaart vor - je nach Umrechnungsfaktor - sind die Duplices bei T_m -25°C nicht mehr stabil (De Ley et al., 1973).

6.1.3. Charakterisierung der gebildeten Hybride mit Hilfe ihres $T_{m(e)}$

Mit Hilfe der $T_{m(e)}$-Bestimmung kann die Spezifität unterschiedlicher Hybridisierungstemperaturen gut veranschaulicht werden:

Aus homologen DNA-Einzelsträngen werden in einem Inkubationsbereich von 15 bis 35°C unter T_m Duplices mit der Stabilität nativer DNA gebildet (Church und McCarthy, 1968; Johnson und Ordal, 1968). Unter optimalen (25° unter T_m) oder verschärften Hybridisierungsbedingungen (< 25° unter T_m) entstehen ausschließlich solche "stabilen Duplices"; unter milden Hybridisierungsbedingungen (> 25° unter T_m) werden jedoch zusätzlich "labile Duplices" gebildet, deren thermische Stabilität geringer ist, als diejenige nativer DNA (De Ley et al., 1973).

Abb.12 zeigt die Schmelzkurven filtergebundener DNA/DNA-Hybride, die bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen gebildet wurden. Bei der gewählten Anfangstemperatur der $T_{m(e)}$-Bestimmung (55°C) dissoziieren die labilen Duplices bereits vollständig. Ihr Anteil an den insgesamt entstandenen Hybriden beträgt im angeführten Beispiel 7o %. In derselben Höhe liegt,unter den entsprechenden Inkubationsbedingungen, die prozentuale Bindung der ^{3}H-DNA eines beliebigen, nicht verwandten, Organismus - vorausgesetzt deren G+C-Gehalt entspricht dem der DNA_F. Es dürfte sich bei der labilen

Duplex demnach um unspezifische Basenpaarungen aufgrund relativ kurzer Sequenzbereiche handeln, die bei gleichem G+C-Gehalt der DNA statistisch auftreten (Johnson und Ordal, 1968).

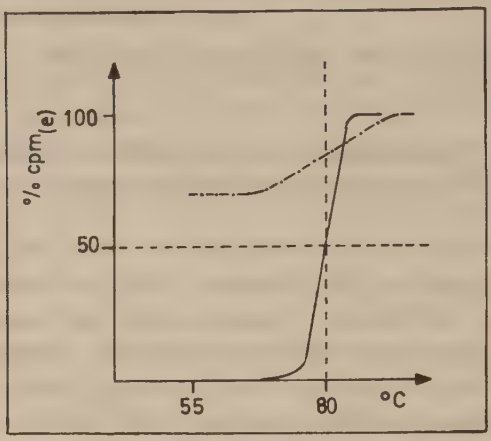


Abb.12:
Thermische Eluierung der ^{3}H-DNA aus filtergebundenen Hybriden eines homologen Systems; schematisch nach Johnson und Ordal (1968).

$cpm_{(e)}$ = eluierte Radioaktivitätsmenge
T_m der nativen DNA im Inkubationsgemisch: 80°C
———: Schmelzkurve von Hybriden, die bei T_m-20° gebildet wurden
-.-.: Schmelzkurve von Hybriden, die bei T_m-35° gebildet wurden

Die stabilen Duplices eines homologen Systems sind von unterschiedlicher thermischer Stabilität, wenn sie bei verschiedenen Inkubationstemperaturen gebildet werden. De Ley et al. (1973) stellten fest, daß im Verhältnis umso weniger Duplices entstehen, je geringer der Abstand der Hybridisierungstemperatur zum T_m gewählt wird. Diese weisen dann etwas höhere Schmelzpunkte auf als Hybride, die unter milderen

Hybridierungsbedingungen gebildet wurden. Das bedeutet: bei einer höheren Inkubationstemperatur, d.h. unter spezifischeren Reaktionsbedingungen, ist zur Bildung thermostabiler Duplices ein größeres Ausmaß an Sequenzhomologie der paarenden Stränge notwendig, als bei niedrigeren Hybridisierungstemperaturen.

Dieser Effekt wirkt sich bei Heteroduplices, deren DNA_F und DNA_S jeweils aus unterschiedlich nah verwandten Organismen stammen, in viel stärkerem Maße aus: Bei derselben optimalen Hybridisierungstemperatur werden umso weniger Duplices gebildet, je geringer die Sequenzhomologie der paarenden Stränge ist (% Homologie, vergl. B.11.4.). Zusätzlich nimmt die thermische Stabilität dieser Duplices mit abnehmendem Homologiegrad ab. Wie unter C.6.1.2. ausgeführt, erniedrigt sich der $T_{m(e)}$ des heterologen Reaktionsprodukts um durchschnittlich $1^{o}C$ pro 1 % ungepaarter Basen. Der Verlauf der thermischen Eluierung der ^{3}H-DNA aus filtergebundenen Heteroduplices mit unterschiedlicher Sequenzhomologie ist in Abb. 13 dargestellt.

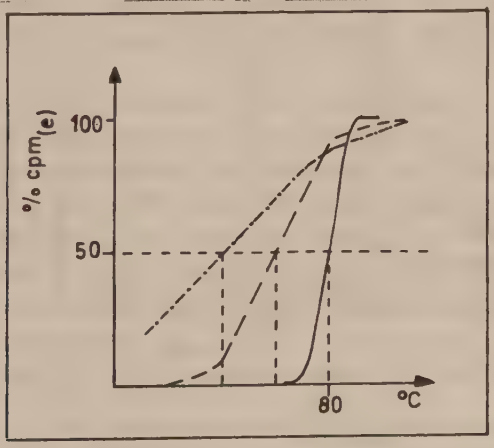


Abb.13:
Thermische Eluierung der ^{3}H-DNA aus filtergebundenen Hybriden eines heterologen Systems; schematisch nach Johnson u.Ordal (1968)
$cpm_{(e)}$ = eluierte Radioaktivitätsmenge.
Hybridisierungstemperatur: T_m -25°C
Homologie von DNA_F und DNA_S: — loo %, -·-·48 %, -.-.- 23 %

6.2. $T_{m(e)}$-Werte von DNA/DNA-Hybriden coryneformer Bakterien mit Mureinen der Gruppe B

6.2.1. Verlauf der Schmelzkurven von Hybriden mit unterschiedlicher Sequenzhomologie

In Abb. 14 ist der Verlauf der thermischen Denaturierung von DNA/DNA-Hybriden dargestellt, welche aus der DNA von B-Typ-Coryneformen gebildet wurden. Als repräsentative Beispiele sind Schmelzkurven von Duplices mit unterschiedlicher Sequenzhomologie ausgewählt.

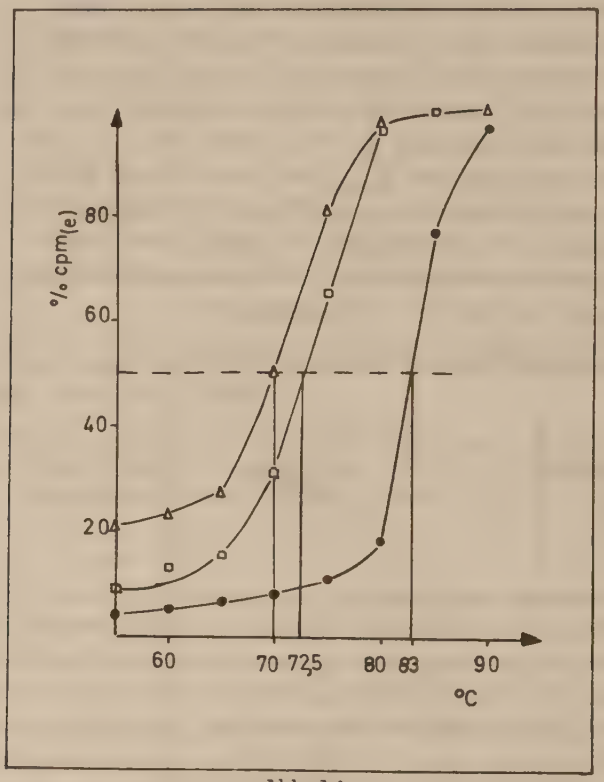


Abb.14:

Schmelzkurven von DNA/DNA-Hybriden aus den vorliegenden Untersuchungen

●-● : C.imperiale (DNA_F) x C.imperiale (DNA_S) - loo % Homologie
□-□ : C.imperiale x E 36/1 - 33 % Homologie
△-△ : C.imperiale x C.bovis - 11 % Homologie

Die geringere Stabilität der Heteroduplices hat, in Übereinstimmung mit den oben angeführten Beispielen aus der Literatur, zur Folge, daß:

1. die Radioaktivität bereits bei niedrigeren Temperaturen vollständig vom Filter eluiert ist,
2. der Temperaturbereich, in dem der DNA-Komplex dissoziiert, gespreizt ist (geringere Steigung der Kurve), und
3. bereits bei Versuchsbeginn (5°C unter Hybridisierungstemperatur) ein größerer Anteil Radioaktivität eluiert wird.

6.2.2. Überprüfung der Homologiebefunde mithilfe des $T_{m(e)}$ der DNA/DNA-Hybride

Wie der vorangehende Versuch zeigt, liefert der $T_{m(e)}$ der DNA/DNA-Hybride zusätzlich zu den Homologiewerten eine Möglichkeit, die untersuchten Organismen zuverlässig in Gruppen unterschiedlichen Verwandtschaftsgrades einzuordnen (Brenner et al., 1972b; De Ley et al., 1973; De Smedt und De Ley, 1977). Um auf diese Weise die DNA-Homologiewerte zu überprüfen, wurden die $T_{m(e)}$-Werte von Duplices bestimmt, die in drei verschiedenen Hybridisierungen gebildet worden waren (Tab.17).

Während der theoretische T_m der nativen DNA im Inkubationsgemisch 86°C beträgt (3 x SSC/3o % FA; 74 % G+C), wurden in den drei durchgeführten Bestimmungen für die homologen Hybride Werte von 76 bis 83°C gemessen. Diese Diskrepanz und die starke Streuung sind vermutlich auf nicht kontrollierbare experimentelle Fehler zurückzuführen. Deshalb erweist es sich als sinnvoller, bei einer vergleichenden Betrachtung nicht die absoluten $T_{m(e)}$-Werte, sondern die jeweilige Differenz $\Delta T_{m(e)}$ zum homologen System zu berücksichtigen.

Tab.17: Vergleich von % Homologie, $T_{m(e)}$ und $\Delta T_{m(e)}$ von DNA/DNA-Hybriden aus drei verschiedenen Hybridisierungen (I, II, III).

Hybridisierungsversuch	DNA_F von	DNA_S von	%Homologie	$^oT_{m(e)}$	$^o\Delta T_{m(e)}$
I	M.lacticum	M.lacticum	loo	83	0
		E 36/1	lol	83	0
		C.laevaniformans	42	74	9
		B.imperiale	29	74	9
		C.bovis	12	68	15
	C.laevaniformans	C.laevaniformans	loo	83	0
		E 36/1	37	75	8
		B.imperiale	34	74	9
		C.bovis	11	69	14
	B.imperiale	B.imperiale	loo	83	0
		E 36/1	31	74	9
		C.bovis	12	7o	13
II	A.terregens	A.terregens	loo	77	0
		C.barkeri	18	64	13
		Ag.ramosus	15	63	14
	M.liquefaciens	M.liquefaciens	loo	76	0
		DSM 2ol43	28	68	8
		B.insectiphilum	29	67	9
	C.barkeri	C.barkeri	loo	77	0
		M.liquefaciens	21	66	11
	S llo	S llo	loo	77	0
		A.terregens	23	64	13
III	Ag.ramosus	Ag.ramosus	loo	8o	0
		A.terregens	15	64	16
	B.insectiphilum	B.insectiphilum	loo	8o	0
		A.terregens	17	65	15
		Ag.ramosus	14	63	17

Die gefundene Korrelation zwischen % Homologie und dem $\Delta T_{m(e)}$ der Hybride ist in Abb. 15 dargestellt.

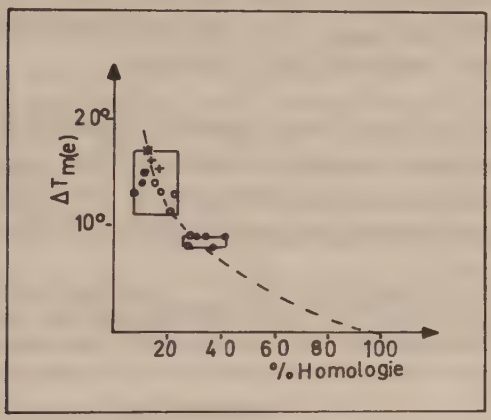


Abb.15:

Zusammenhang zwischen $\Delta T_{m(e)}$ und % Homologie der DNA/DNA-Hybride aus den Hybridisierungen I(•), II (o) und III (+) (siehe Tabelle 17)

Die Hybride mit 11 bis 23 % und mit 28 bis 42 % Homologie bilden zwei deutlich getrennte Gruppen auf dem Diagramm. Filter mit Hybriden, deren Sequenzhomologie zwischen 5o und loo % beträgt, waren zum Zeitpunkt der DNA/DNA-$T_{m(e)}$-Messungen nicht mehr verfügbar.

Es fällt auf, daß die $\Delta T_{m(e)}$-Werte der Duplices mit niedrigerem Homologiegrad stärker streuen als die $\Delta T_{m(e)}$ höher verwandter DNA-Spezies. Ein Grund hierfür liegt vermutlich in der größeren Ungenauigkeit beim Zählen

geringer Radioaktivitätsmengen, wie sie im Fall niedriger Homologie bei der Bestimmung der prozentualen Bindung und noch viel mehr der vom Filter eluierten ^{3}H-DNA gegeben ist. Demnach ist - unter den vorliegenden Bedingungen - eine Quantifizierung des Ähnlichkeitsgrades zweier Organismen aufgrund des $T_{m(e)}$ ihres DNA/DNA-Hybrids bei weniger als ca. 2o % Homologie nicht möglich.

Der vorliegende Befund zeigt gute Übereinstimmung mit entsprechenden Vergleichen zwischen % Homologie und $T_{m(e)}$-Werten der gebildeten Duplices, die De Smedt und De Ley (1977) an DNA/DNA-Hybriden von Agrobacterium durchführten (Tab.18).

TAb.18: Aussage von % Homologie und $T_{m(e)}$-Werten von DNA/DNA-Hybriden über den Ähnlichkeitsgrad der untersuchten DNA-Spezies. 1) nach De Smedt und De Ley (1977)

B-Typ-Coryneforme		Agrobacterium 1)			
% DNA-Homologie	$^{o}\Delta T_{m(e)}$	% DNA-Homologie	$^{o}T_{m(e)}$	$^{o}\Delta T_{m(e)}$	Ähnlichkeitsgrad der untersuchten DNA-Spezies
1oo	0	1oo - 84	75	0	homolog
		6o - 45	69 - 68	6 - 7	heterolog; Organismen vom selben "genetischen Cluster"
42- 28	8 - 9	11 - 1o	65 - 64	1o - 11	noch deutliche Genomähnlichkeit
		± 6	63 - 62	12 - 13	schwache, aber signifikante Genomähnlichkeit
		< 4	niedrig		absolut heterolog

7. DNA/rRNA-Hybridisierungen

Wie in der Einleitung ausgeführt, kann die DNA/DNA-Hybridisierung nur zur Aufklärung von taxonomischen Verhältnissen im Bereich von Spezies beitragen. Unter C.5.3.5 wurde gezeigt, daß der Grad der Verwandtschaft unter den coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe B durch diese Methode nicht genügend geklärt wird. Deshalb wurden mit ausgewählten Organismen der Gruppen I bis VI DNA/rRNA-Hybridisierungen durchgeführt, welche sichere taxonomische Aussagen im Bereich von Gattungen und Familien ermöglichen. Vergleichswerte zwischen den B-Typ-Coryneformen und Vertretern unterschiedlich nah verwandter Taxa lieferten die in den Untersuchungen mitgeführten Cellulomonas-Stämme, sowie Ps.cuvatus und S.aureus als grampositive Organismen mit niedrigem G+C-Gehalt der DNA.

7.1. Isolierung der ^{3}H-rRNA

7.1.1. Zeitpunkt der Zellernte

Bei der Aufarbeitung stationärer Zellen zur Präparation radioaktiver rRNA lieferte die elektrophoretische Auftrennung des phenolgereinigten Rohextrakts (siehe B.13.4.) neben den Banden der 16S- und 23S-rRNA (Abb.4) noch weitere Banden mit jeweils kürzeren Laufstrecken. Diese waren höchstwahrscheinlich auf Abbauprodukte der rRNA zurückzuführen. Um die einzelnen rRNA-Arten unfragmentiert zu erhalten, wurde deshalb streng darauf geachtet, daß sich die verwendeten Zellen noch in der logarithmischen Phase befanden. Zu diesem Zweck wurde für jeden untersuchten Stamm (M.lacticum, C.bovis, C.betae, Ag.ramosus) zunächst eine Wachstumskurve unter Anzuchtbedingungen (loo ml Medium in 1 l-Erlenmeyerkolben, geschüttelt bei 3o°C) erstellt. Daraus war zu ersehen, daß die Kulturen der vier Stämme spätestens bei einer $O.D._{578nm}$ = o,7 bis o,9 geerntet werden mußten.

7.1.2. Verlauf der ^{3}H-rRNA-Reinigung

Die Reinigung der 23S-rRNA (siehe auch C.7.2.1.) wurde - wie die der radioaktiven DNA- bei zwei der durchgeführten Präparationen durch Zählen eines Aliquots der Nukleinsäurelösung nach jedem Reinigungsschritt verfolgt (Tab.19).

Tab.19: Abtrennung radioaktiv markierter Substanzen im Verlauf der Reinigung der 23S-rRNA aus Ag.ramosus und C.betae

	Ag.ramosus	C.betae
Rohextrakt	$2,1 \times 10^{8}$ cpm = 1oo %	$1,6 \times 10^{8}$ cpm = 1oo %
PAA-Elektrophorese, Eluierung der 23S-Banden	$3,0 \times 10^{7}$ cpm = 14 %	$3,0 \times 10^{7}$ cpm = 19 %
Phenolausschüttlung	$3,2 \times 10^{7}$ cpm = 14 %	$3,1 \times 10^{7}$ cpm = 19 %
Äthanol-Fällung	$1,4 \times 10^{7}$ cpm = 7 %	$1,0 \times 10^{7}$ cpm = 6 %

Durch Versetzen des Mediums mit ^{3}H-Uracil wird neben Nukleotid-Vorstufen das gesamte RNA-Material der Zelle radioaktiv markiert. Geht man davon aus, daß der Anteil der rRNA 5o % beträgt und davon wiederum die 23S-Fraktion grob zwei Drittel einnimmt - 33oo Nukleotide 23S gegenüber 177o Nukleotiden von 16S + 5S (Pace, 1973) - sollte ein Drittel der Gesamtaktivität als 23S-rRNA vorliegen. Die Diskrepanz zum experimentellen Befund ist wohl durch teilweisen Abbau oder Fragmentierung der RNA während der Präparation sowie durch Verluste bei der Phenolausschüttlung des Rohextrakts und Eluierung der PAA-Gelstücke zu erklären. Bei der Phenolausschüttlung der 23S-Fraktion ging kein radioaktiv markiertes Material verloren. Die abschließende Äthanolfällung entfernte nochmals die Hälfte bis ein Drittel der Aktivität.

Die spezifischen Aktivitäten der gewonnenen RNA sind in Tabelle 2o wiedergegeben.

Tab.2o: Spezifische Aktivität der 23S-rRNA-Präparationen

23 S-rRNA aus	spezifische Aktivität [cpm/µg RNA]
Ag.ramosus	77 ooo
C. betae	67 ooo
C. bovis	1o3 ooo
M. lacticum	111 ooo

7.2. Theoretische Überlegungen zur DNA/rRNA-Hybridisierung

7.2.1. Vergleich von 16S- und 23S-rRNA

Wie zuerst Yankofsky und Spiegelman (1963) für Bacillus megaterium durch Sättigungs- und Konkurrenzversuche bewiesen, werden 16S- und 23S-rRNA von verschiedenen Cistronen codiert. Bei DNA/rRNA-Hybridisierungen zu taxonomischen Zwecken differieren allerdings die prozentualen Bindungen kaum, die mit den beiden RNA-Arten getrennt erhalten werden (Takahashi et al., 1967; Moore und McCarthy, 1967).

Der $T_{m(e)}$ der Hybride, der bei DNA/rRNA-Hybridisierungen eine wesentliche Rolle spielt (siehe C.7.2.4.2.), unterscheidet sich jedoch in bestimmten Fällen bei Einsatz von 16S- oder 23S-rRNA desselben Organismus. Bendich und McCarthy (197o) stellten fest, daß bei Vertretern verschiedener phylogenetischer Entwicklungslinien, z.B. E.coli und grampositiven Bakterien oder E.coli und der Erbse $\Delta T_{m(e)}$ (Definition s. C.6.2.2.) beim größeren rRNA-Molekül (23S bzw.25S) zunimmt

gegenüber den entsprechenden Werten des 16S-Moleküls. Daraus folgern die Autoren, daß sich das große rRNA-Molekül im Verlauf der Evolution etwas weniger konservativ verhalten hat. Bei den Hybriden aus DNA und rRNA von näher verwandten Organismen, z.B. E.coli und neun anderen gram-negativen Bakterienspezies (Moore und McCarthy, 1967), ist dieser Unterschied nicht zu bemerken. Auch Versuche mit Peptokokken und Staphylokokken ergaben, daß sich weder die prozentuale Bindung noch der $T_{m(e)}$ der Hybride bei Verwendung von 23S- anstelle von 16S-rRNA signifikant unterscheiden (Buhl, 198o).

Obwohl ein Vergleich der vorliegenden Hybridisierungsergebnisse mit den entsprechenden Daten der 16S-rRNA-Partialsequenzierung (Stackebrandt et al., 198ob) angestellt werden sollte, war es also durchaus zulässig, in die Reasoziierungsversuche 23S-rRNA einzusetzen. Bei der Präparation dieser rRNA-Spezies kann nämlich im Gegensatz zur 16S-Fraktion eine Verunreinigung durch andere RNA-Arten ausgeschlossen werden.

7.2.2. Beeinflussung des Reaktionsablaufs durch verschiedene Paramter

Die optimalen Reaktionsbedingungen der DNA/rRNA-Hybridisierung sind von denselben Parametern abhängig, wie bereits für die DNA/DNA-Hybridisierung erörtert (C.5.1.2.).

7.2.3. Nachbehandlung der filtergebundenen DNA/rRNA-Hybride

Neben exakt gepaarten Duplices, den sog. "real hybrids", entstehen bei der Hybridisierung auch Komplexe, die nur teilweise komplementär sind und durch RNase-Behandlung

entfernt werden können, die sog. "sensitiven Komplexe" (Gillespie, 1968). Diese dissoziieren außerdem bei Inkubation in RNA-freiem Hybridisierungsmedium (Gillespie, 1968; Gillespie und Gillespie, 1971).

Entgegen zahlreichen Vermutungen scheint der sensitive Komplex nicht aus "RNA-Schwänzen" zu bestehen, die sich z.B. dann bilden könnten, wenn zwei RNA-Moleküle gleichzeitig mit demselben DNA-Stück reagieren (Gillespie, 1968): Der Anteil des sensitiven Komplexes am Rohhybrid (= real hybrid + sensitiver Komplex) hängt nämlich nicht von der Länge der RNA-Fragmente im Reaktionsgemisch ab, sondern lediglich von der Spezifität der Reaktionsbedingungen (vergleiche C.6.1.3.: "labile Duplex"; De Ley, 1973).

Durch Entfernung des sensitiven Komplexes aus den Hybriden wird bei einer RNase-Behandlung die prozentuale Bindung der eingesetzten RNA an die DNA_F reduziert (Takahashi et al., 1967). Man nimmt an, daß dabei auch einzelne ungepaarte Basen ausgeschnitten werden (Gillespie und Gillespie, 1971). RNA-Fragmente, die nach der Enzymbehandlung aus Hybriden zurückgewonnen wurden, welche bei 36° unter T_m entstanden, erwiesen sich als mindestens zehn Nukleotide lang (Takahashi et al., 1967). Bei Hybridisierungen 28° unter T_m, also unter spezifischeren Reaktionsbedingungen, erstrecken sich die exakt gepaarten Stücke über wenigstens 5o Nukleotide (Gillespie und Gillespie, 1971). Da der Hybridschmelzpunkt von der Länge der gepaarten Stücke abhängt (Laird et al., 1969) - die entstandenen kurzen Fragmente dissoziieren bereits bei niedrigeren Temperaturen ab als die unbehandelte Hybrid-RNA - erniedrigt sich durch die RNase-Inkubation auch der $T_{m(e)}$. De Ley und De Smedt (1975) stellten fest, daß der $T_{m(e)}$ zwar bei den homologen Hybriden vor und nach der RNase-Behandlung gleich ist, bei den untersuchten heterologen Beispielen jedoch um unterschiedliche Beträge vermindert wird.

7.2.4. Auswertung der DNA/rRNA-Hybridisierungen

7.2.4.1. Prozentuale Bindung

Bei der Auswertung von DNA/rRNA-Hybridisierungen zu taxonomischen Zwecken spielt die prozentuale Bindung - im Gegensatz zur DNA/DNA-Hybridisierung - nur eine untergeordnete Rolle. Unter zahlreichen Bakterienarten und auch bei höheren Pflanzen wurde beobachtet, daß DNA entfernt verwandter Taxa oft mehr rRNA einer bestimmten Spezies bindet, als DNA eng verwandter Gruppen oder sogar des untersuchten Stammes selbst (Doi und Igarashi, 1965; Moore und McCarthy, 1967; Bendich und McCarthy, 197o).

Der Grund für die unterschiedlich hohen Bindungen ist vor allem darin zu sehen, daß in verschiedenen Organismen nicht dieselbe Anzahl von rRNA-Cistronen vorliegt. Für Bakterien wurden Werte von drei bis zehn Kopien pro Genom ermittelt (Bendich und McCarthy, 197o). Dabei liegen die Cistrone für 5S-, 16S- und 23S-rRNA jeweils in gleicher Anzahl vor (Pace, 1973). Bei höheren Pflanzen kann man innerhalb derselben Familie eine unterschiedliche Anzahl von rRNA-Cistronen finden (Bendich und McCarthy, 197o). In Bakteriengattungen, die über DNA/rRNA-Hybridisierungen definiert wurden, unterscheiden sich die prozentualen Bindungen um den Faktor zwei bis drei (De Smedt und De Ley, 1977; Gillis und De Ley, 198o; De Smedt et al. 198o).

Neben der Anzahl der Cistrone spielt aber auch noch die Größe des Genoms und dessen Replikationszustand eine Rolle für das Ausmaß der Kreuzreaktion. Man darf hier deshalb auf keinen Fall von "rRNA-Homologie" sprechen (De Smedt und De Ley, 1977).

7.2.4.2. $T_{m(e)}$

Ein wesentlich besseres Mittel zur Quantifizierung der Sequenzunterschiede bzw. -ähnlichkeiten stellt die thermische Stabilität der Hybride dar (Moore und McCarthy, 1967). Für ausgewählte Vertreter höherer Pflanzen - bei denen zur Aufklärung der Phylogenie auch morphologische und entwicklungsphysiologische Daten fossiler und rezenter Vertreter herangezogen werden können - erhielten Bendich und McCarthy (197o) aufgrund des $T_{m(e)}$ der DNA/rRNA-Hybride die erwartete Reihenfolge abnehmender Verwandtschaft der Erbse zu anderen Dikotyledonen, Monokotyledonen und Gymnospermen.

7.2.4.3. Ähnlichkeitsdiagramme

Eine anschauliche Information über die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der untersuchten Organismen liefert die Aufstellung von Ähnlichkeitsdiagrammen, die im Arbeitskreis von De Ley entwickelt wurde (Abb.16).

In den Ähnlichkeitsdiagrammen werden von den Hybridisierungswerten einer rRNA-Spezies gegen alle getesteten DNA_F die prozentualen Bindungen auf der Abszisse und die $T_{m(e)}$-Werte auf der Ordinate aufgetragen. Verwandte Organismen gruppieren sich dann in mehr oder weniger geschlossenen Arealen. Die prozentuale RNA-Bindung kann nur zur Abgrenzung von Taxa verwendet werden. Der $T_{m(e)}$-Unterschied zum homologen Hybrid ($= \Delta T_{m(e)}$), als Maß für die rRNA-Ähnlichkeit, zeigt dagegen eine gute Übereinstimmung mit der gesamten phänotypischen Ähnlichkeit von Bakteriengattungen (De Smedt et al., 198o).

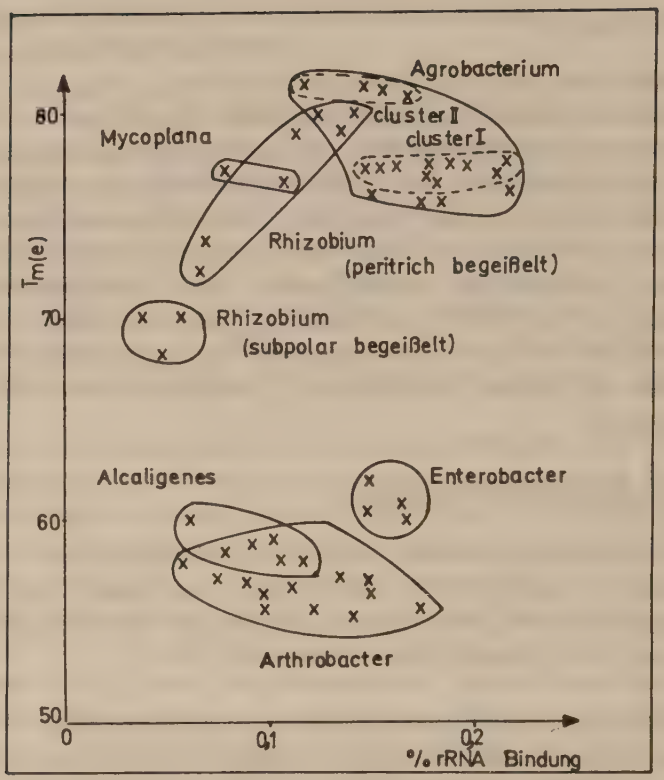


Abb.16:

Ähnlichkeitsdiagramm der Hybride zwischen 16S-rRNA von Agrobacterium rhizogenes und DNA verschiedener Bakterien.

Vereinfacht nach De Smedt und De Ley (1977).
x: Positionen der untersuchten Organismen. Weitere Erklärungen im Text.

Vergleicht man die Ähnlichkeitsdiagramme, die für die RNA verschiedener Stämme einer verwandten Bakteriengruppe erstellt wurden, so kann man folgendes feststellen:

Bestimmte Organismen - mit hohen $T_{m(e)}$-Werten - verändern jeweils die Positionen innerhalb ihres Areals. Andere Stämme - mit niedrigen $T_{m(e)}$-Werten - nehmen dagegen stets dieselbe Lage ein. Die Gruppe der Organismen, die ihre Stellungen wechseln, bezeichnen Gillis und De Ley (198o) als "RNA-Superfamily".

7.3. DNA/rRNA-Hybridisierungen bei coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe B

7.3.1. Nachinkubation der DNA/rRNA-Hybride

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, eine Nachinkubation in fünffachem Puffervolumen unter Hybridisierungsbedingungen (= 1 ml 5 x SSC/25 % FA; 6o°C) durchgeführt, sowie eine anschließende Enzymbehandlung mit RNase A und T_1-RNase, die RNA-Einzelstränge am 3'-Ende von Cytidin und Uridin bzw. Guanosin spalten (vergl.C.7.2.3.). Durch die Nachinkubation wurden 35 bis 5o % der gebundenen Aktivität entfernt, die RNase-Verdauung verminderte die Bindung dann nochmals um sieben bis neun % (ermittelt durch Bestimmung der abgelösten Radioaktivität im jeweiligen Inkubationsgemisch).

7.3.2. Prozentuale Bindung

In den vorliegenden Untersuchungen ersteckt sich die prozentuale Bindung der eingesetzten rRNA an die DNA_F über einen Bereich von o,43 bis 4,79 % (Tab.21). Sie läßt, wie oben erörtert, in vielen Fällen keinen Zusammenhang mit der Verwandtschaft der Organismen erkennen. Für das Hybrid DNA(C.uda)/RNA(Ag.ramosus) ergibt sich bei einer sehr hohen Bindung von 3,23 % ein $\Delta T_{m(e)}$ von 8,5°C. In ihm wurden die rRNA-Gene eines Stammes mit Murein der Gruppe A mit der rRNA eines B-Typ-Organismus verglichen.

DNA/rRNA-Hybridisierungen bei coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe B und Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit d

Stamm (DNA_F) (Nr)[1]	x $RNA_{M.lacticum}$ % B/[2] lo µg DNA_F	$^oT_{m(e)}$	$^o\Delta T_{m(e)}$	% H[3] DNA/DNA	x $RNA_{C.bovis}$ % B/ lo µg DNA_F	$^oT_{m(e)}$	$^o\Delta T_{m(e)}$	% H DNA/DNA	x RNA % B/ lo µg
M.lacticum (1)	1.69	81.5	0	loo	1.97	73.o	6.5	11	1.
C.laevaniformans (2)	o.63	77.5	4,o	43					o.
B.imperiale (3)	2.43	8o.o	1.5	3o	4.31	72.5	7.o	12	2.
C.bovis (4)	1.18	75.o	6.5	13	4.59	79.5	0	loo	2.
C.betae (5)	1.94	76.5	5.o	16	3.49	73.5	6.o	13	4.
C.oortii (6)									1.
C.poinsettiae (7)	2.76	75.o	6.5	(1o-2o)					
B.citreum (8)	3.63	74.5	7.o	(1o-2o)					4.
A.terregens (9)	o.95	78.5	3.o	(18-33)					o.
B.albidum (1o)	2.o8	78.5	3.o	(18-33)					1.
B.insectiphilum (11)	2.46	77.5	4.o	(18-33)	4.27	73.5	6.o	(11-15)	
B.saperdae (12)	1.42	79.5	2.o	21					
B.testaceum (13)	3.17	77.5	4.o	(18-33)					3.
Ag.ramosus (14)	1.46	78.5	3.o	16	2.33	73.5	6.o	13	1.
B.helvolum (15)	1.81	76.5	5.o	16	3.38	75.o	4.5	15	2.
C.aquaticum (16)	o.43	76.o	5.5	18					1.
C.insidiosum (17)	2.16	76.5	5.o	14					2.
C.mediolanum (18)	1.78	77.o	4.5	(1o-2o)					
C.michiganense (19)									2.
C.nebraskense (2o)	1.89	77.o	4.5	(1o-2o)					
Ce.cellasea				9	o.97	71.o	8.5		
Ce.uda	2.99	74.o	7.5						
Lb.curvatus	o.87	67.o	14.5		1.14	68.o	11.5		
S.aureus	1.55	65.o	16.5		1.99	66.o	13.5		

r den angegebenen Nummern sind die einzelnen Stämme in Ähnlichkeits-ramme (Abb.17 bis 2o) eingezeichnet.

prozentuale Bindung der eingesetzten rRNA an die DNA_F (berechnet auf lo µg/DNA_F)

% Homologie (der DNA/DNA-Hybride). Liegt kein DNA-Homologiewert für beiden Organismen der getesteten DNA- bzw. RNA-Spezies vor, ist der ich der DNA-Homologiewerte in Klammern angegeben, der zwischen den prechenden Gruppen (mit identischem Mureintyp) ermittel wurde.

DNA/rRNA-Hybridisierungen I und II wurden in verschiedenen Ansätzen hgeführt.

= nicht bekannt.

In dem DNA/rRNA-Hybrid C.mediolanum/Ag.ramosus, das einen $\Delta T_{m(e)}$ von 3,5°C aufweist, werden dagegen nur 1,58 % der eingesetzten RNA gebunden. Dabei konnte die deutliche Genomähnlichkeit dieser beiden Organismen bereits durch die DNA/DNA-Hybridisierungen aufgezeigt werden. Selbst bei den hochverwandten Vertretern der Gruppe IV (DNA-Homologie : 7o bis loo %) unterscheiden sich die prozentualen Bindungen beim Vergleich mit derselben rRNA-Spezies teilweise sehr erheblich.

7.3.3. $T_{m(e)}$-Werte

Die Schmelzkurven der $T_{m(e)}$-Bestimmung (keine Abbildung) zeigen im Zusammenhang mit dem Verwandtschaftsgrad der Organismen dieselben Erscheinungen, wie bereits für die DNA/DNA-Hybride dargestellt (C.6.2.1.). Im Versuchsablauf lösten sich durchschnittlich 35 % der DNA von den Filtern ab. Moore und McCarthy (1967), die während ähnlicher Versuche mit E.coli bis 2o % DNA_F-Verluste bestimmten, wiesen nach, daß der Hauptanteil der DNA erst bei Temperaturen desorbiert, bei denen das Hybrid schon weitgehend dissoziiert ist. Die Lage des zu bestimmenden $T_{m(e)}$ wird dadurch also nicht beeinflußt.

Der berechnete T_m für einen für die rRNA angenommenen G+C-Gehalt von 53 % beträgt im verwendeten Inkubationsgemisch 8o°C. Wie Tab.21 zeigt, wurden für die Schmelzpunkte der homologen Hybride aus getrennt durchgeführten Hybridisierungen zwischen 79,5 und 83°C gemessen. Aus diesem Grund ist es nicht sinnvoll, die $T_{m(e)}$-Werte der verschiedenen Hybridisierungen im Einzelnen miteinander zu vergleichen. Tab.22 verdeutlicht, daß mit einem höheren $T_{m(e)}$ der homologen Duplex eine genauere Differenzierung der Ähnlichkeit der untersuchten Organismen verbunden ist:

1. Die $T_{m(e)}$-Werte derjenigen Hybride, die jeweils aus DNA und rRNA von Organismen mit 10 bis 20 % DNA-Homologie bestehen, dehnen sich über einen umso größeren Bereich aus, je höher der $T_{m(e)}$ des homologen Hybrids liegt.

2. Auch die $\Delta T_{m(e)}$-Werte der A-Typ-Organismen erscheinen in dieser Reihenfolge weiter auseinandergezogen (Vergleich der horizontalen Reihen in Tab.22).

Tab.22: Vergleich ausgewählter $\Delta T_{m(e)}$-Werte der DNA/RNA-Hybride unter Berücksichtigung des $T_{m(e)}$ des homologen Hybrids der jeweiligen Hybridisierung.

1) Hybridisierung I und II mit RNA Ag.ramosus siehe Tab.21.

Hybridisierung mit RNA aus:	$^{o}T_{m(e)}$ des homologen DNA/RNA-Hybrids	Bereich der $^{o}T_{m(e)}$, über den sich die Werte der Stämme mit 10-20% DNA-Homologie ausdehnen	$^{o}T_{m(e)}$ der Hybride mit DNA aus:			
			Ce.cellasea	Ce.uda	Lb.curvatus	S.aureus
C.betae	79.5	2.0	-			
C.bovis	79.5	2.5	-	8.5	11.5	13.5
Ag.ramosus I[1)]	80.0	3.0				
M.lacticum	81.5	4.0	7.5	-	14.5	16.5
Ag.ramosus II[1)]	83.0	-	8.5	10.0	15.5	18.0

Die Ursache für diese offensichtlich unterschiedliche Spezifität der Reaktionsbedingungen der einzelnen Hybridisierungen kann nur in nicht kontrollierbaren experimentellen Fehlern gesehen werden.

7.3.4. Ähnlichkeitsdiagramme

Durch die Ähnlichkeitsdiagramme der vier untersuchten rRNA-Spezies (Abb.17 bis 2o) wird verdeutlicht, daß die coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe B eine "RNA-Superfamily" (vergl.C.7.2.4.3.) bilden: Die Lokalisierung der B-Typ-Coryneformen in den vier Diagrammen ist innerhalb eines abgegrenzten Areals jeweils unterschiedlich; dagegen sind die Positionen der mitgeführten A-Typ-Organismen zueinander und zum Areal der B-Typ-Organismen stets gleich orientiert. Aufgrund dieser Kriterien verhält sich C.bovis, dessen taxonomische Stellung auf der Basis der DNA/DNA-Hybridisierungen nicht zu erkennen war (C.5.3.5.), eindeutig als Mitglied der "RNA-Superfamily" der übrigen B-Typ-Coryneformen.

Im Ähnlichkeitsdiagramm von Ag.ramosus (Abb.2o) wurden $T_{m(e)}$-Werte zweier getrennt durchgeführter Hybridisierungen (s.Tab.21) eingetragen. Der $T_{m(e)}$ der homologen Hybride differierte hierbei um $3^{o}C$ (Hybridisierung I: $8o^{o}C$; Hybridisierung II: $83^{o}C$ - nicht in das Diagramm eingezeichnet). Damit hängt es zusammen, daß die A-Typ-Coryneformen Ce.uda und Ce.cellasea mit $T_{m(e)}$ = 74,5 bzw. $73,o^{o}C$ überraschenderweise näher verwandt zu Ag.ramosus erscheinen als der B-Typ-Organismus C.bovis mit $T_{m(e)} = 72,o^{o}C$.

Auf eine Angleichung der Werte beider Hybridisierungen - unter Berücksichtigung der $T_{m(e)}$-Differenz der beiden homologen Hybride - wurde verzichtet, da eine sinnvolle Korrektur aus folgendem Grund problematisch erschien:
Aus Tab.21 geht hervor, daß in allen Hybridisierungen die $T_{m(e)}$-Werte der zu den B-Typ-Coryneformen entfernt verwandten Organismen Lb.curvatus und S.aureus wie erwartet nahezu gleich sind, obwohl die $T_{m(e)}$ der jeweils homologen Hybride von

79,5 bis 83,o°C variieren. Tab.22 zeigt, daß dagegen die $\Delta T_{m(e)}$-Werte ein falsches Bild unterschiedlicher Ähnlichkeit dieser A-Typ-Organismen zu den untersuchten B-Typ-Vertretern liefern. Im Bereich engerer Verwandtschaft schaltet jedoch die Betrachtung der $\Delta T_{m(e)}$-Werte als Maß für die rRNA-Cistron-Ähnlichkeit das Problem der unterschiedlichen $^{o}T_{m(e)}$ der homologen Hybride weitgehend aus. Für C. bovis und die beiden untersuchten Cellulomonas-Stämme ergeben sich in diesem Fall die erwarteten Ähnlichkeitsabstufungen zu Ag. ramosus (Tab.23).

Tab.23: $\Delta T_{m(e)}$-Werte der DNA/rRNA-Hybride aus Ag.ramosus-RNA und DNA von C.bovis, Ce.uda und Ce.cellasea

1) Mittelwert aus: DNA (Ag.ramosus)/RNA (C.bovis): $T_{m(e)} = 8^{o}C$
und: DNA (C.bovis)/RNA (Ag.ramosus): $T_{m(e)} = 6^{o}C$

DNA/rRNA-Hybrid	$\Delta T_{m(e)}$	$T_{m(e)}$ des homologen DNA/rRNA-Hybrids (Ag.ramosus)
Ag.ramosus / C.bovis	7,o°C[1)]	8o°C
Ag.ramosus / Ce. uda	8,5°C	83°C
Ag.ramosus / Ce.cellasea	1o,o°C	83°C

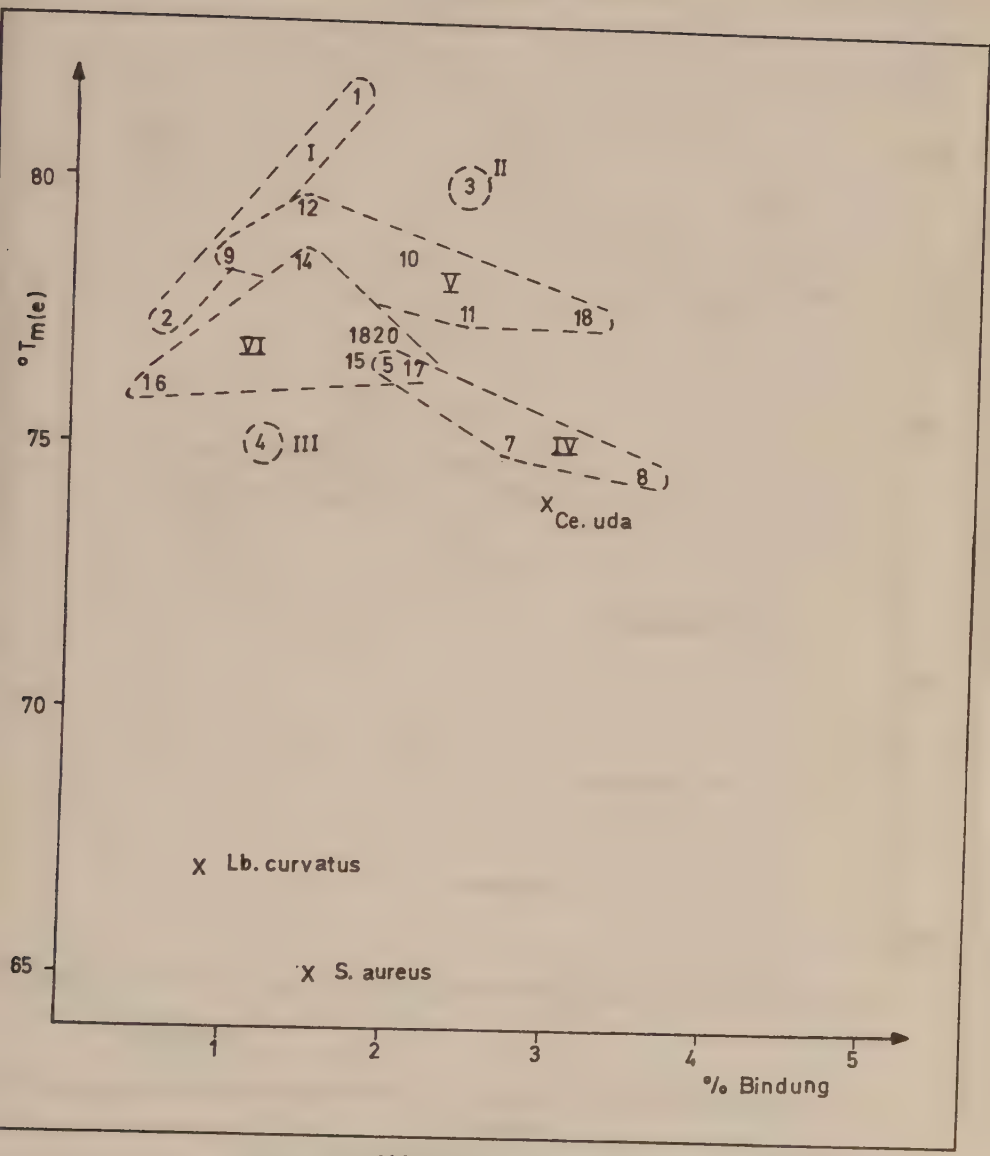


Abb.17:
Ähnlichkeitsdiagramm der RNA *M.lacticum*

Die untersuchten Stämme wurden mit Nummern bezeichnet, welche aus Tab. 21 zu ersehen sind. Durch gestrichelte Linien wurden die Areale angedeutet, die Organismen mit identischem Mureintyp einnehmen (Gruppen I bis VI)

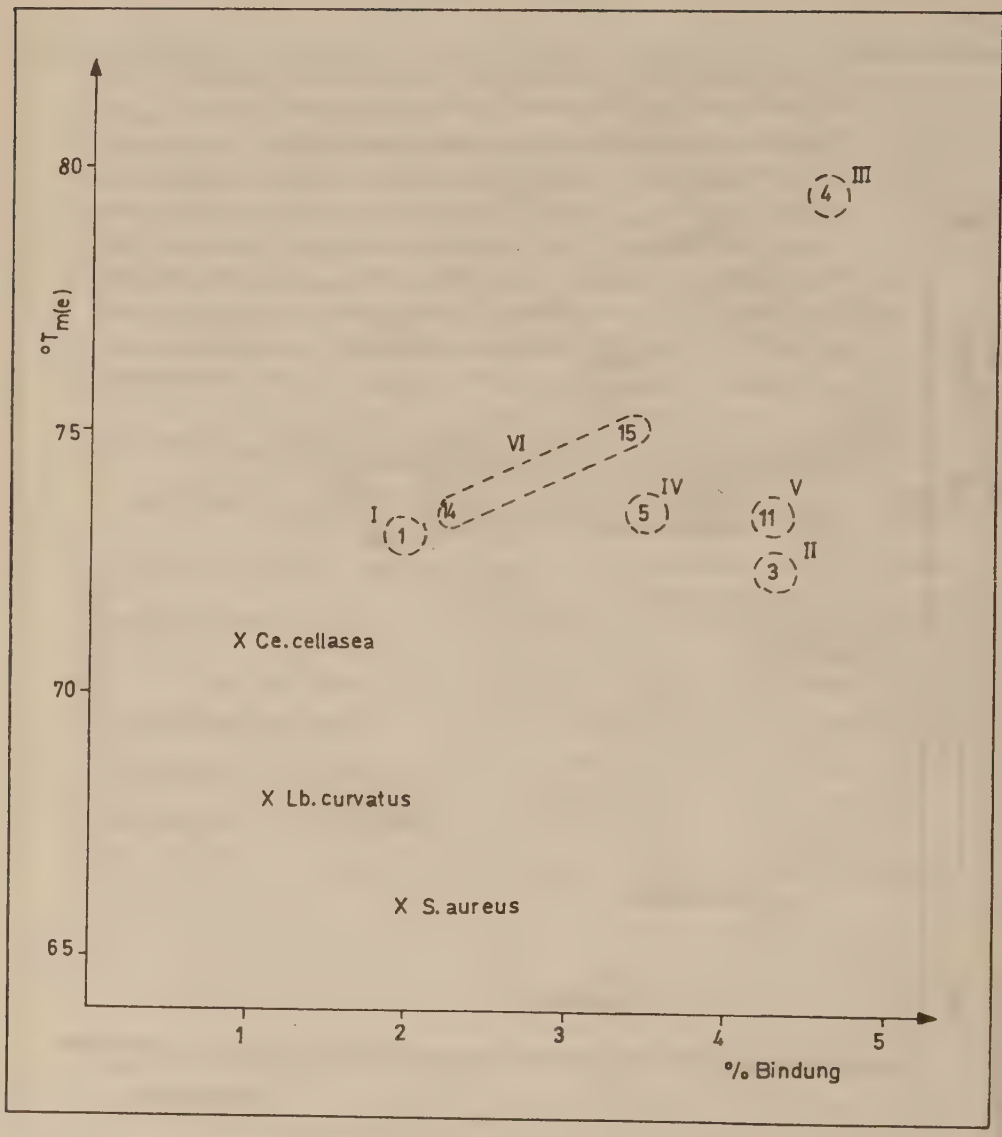


Abb.18:

Ähnlichkeitsdiagramm der RNA C.bovis
(Legende siehe Abb.17)

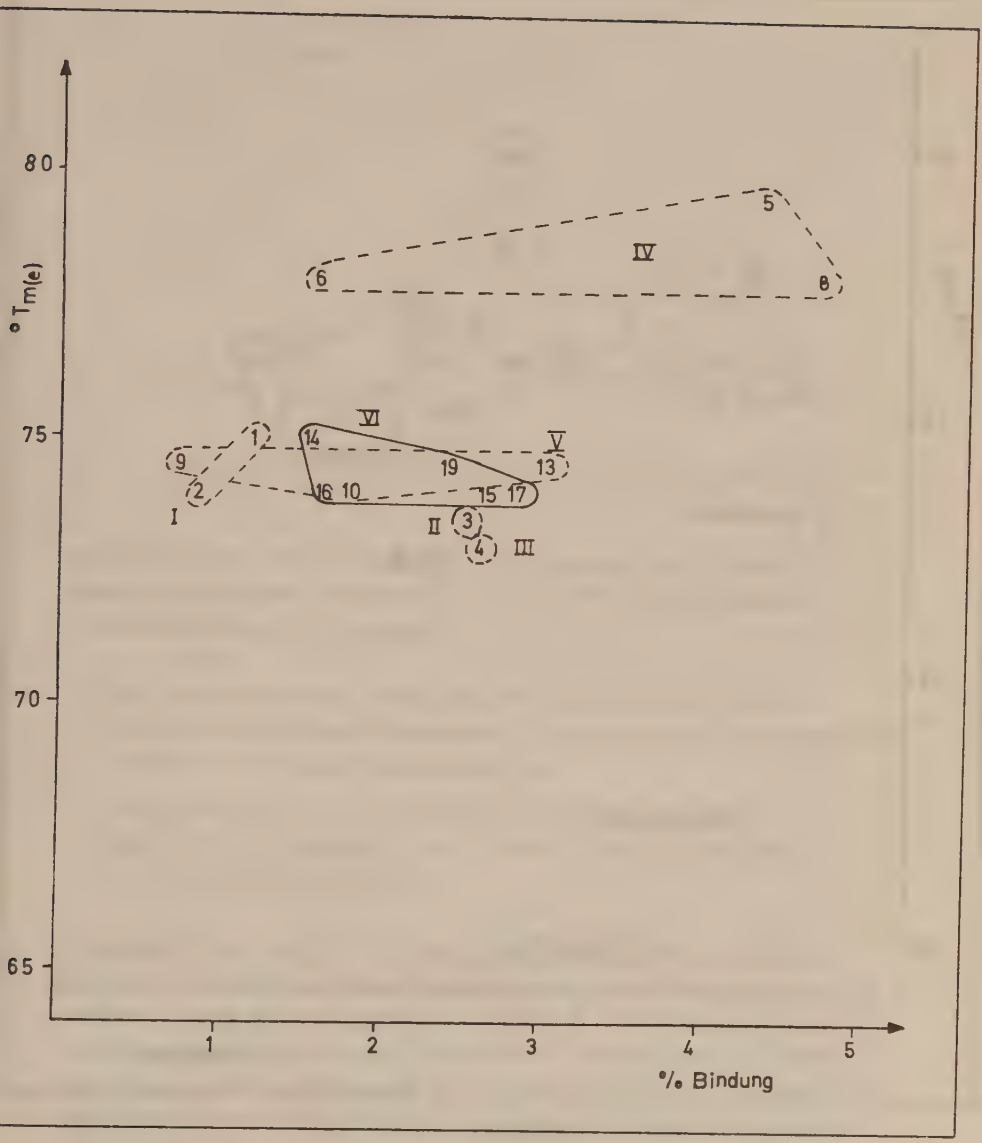


Abb.19:

Ähnlichkeitsdiagramm der RNA C.betae
(Legende siehe Abb.17)

In dem vorliegenden Hybridisierungsversuch wurden keine A-Typ-Organismen mitgeführt.

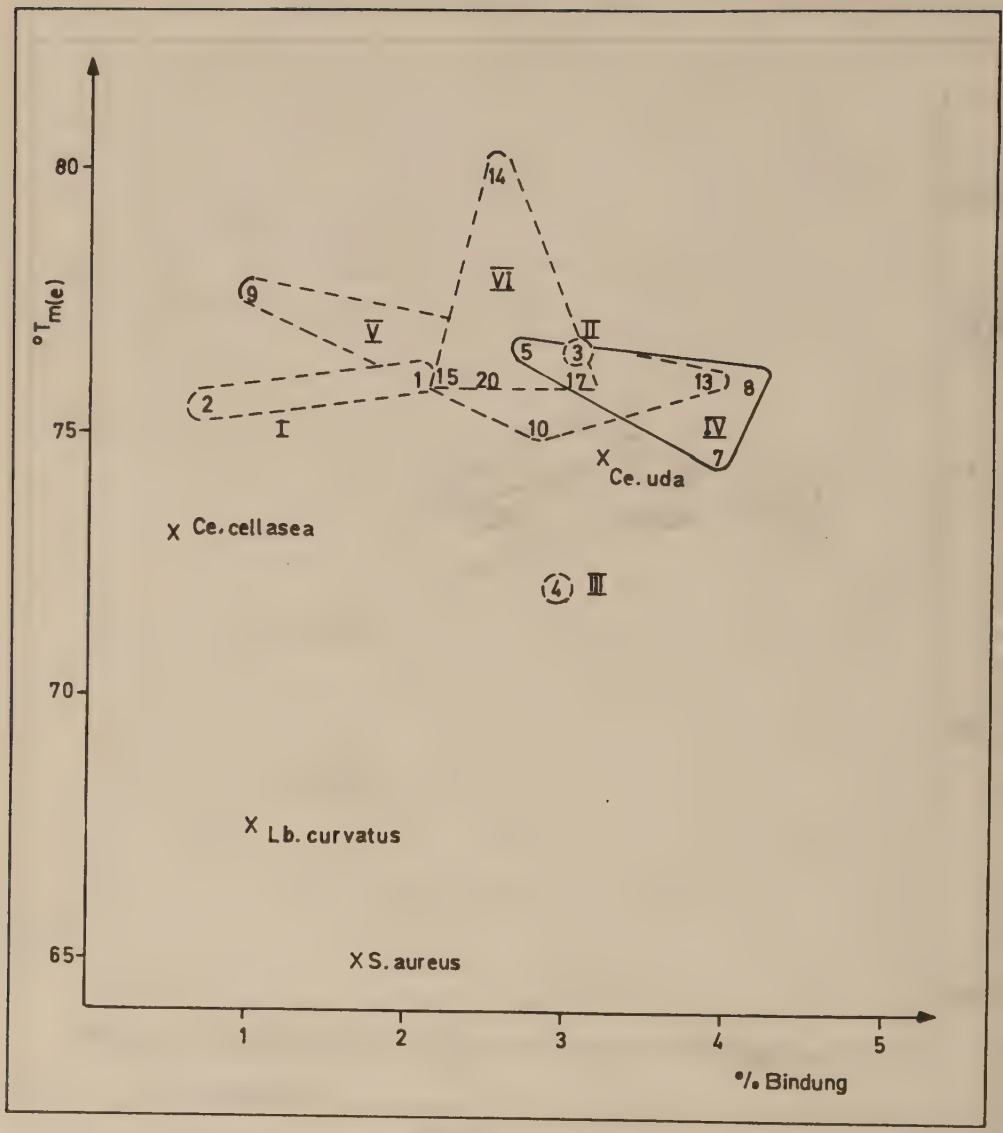


Abb.2o:

Ähnlichkeitsdiagramm der RNA Ag. ramosus
(Legende siehe Abb.17)

Die Werte der B-Typ-Organismen (mit Zahlen bezeichnet) stammen aus Hybridisierung I, diejenigen der A-Typ-Organismen (namentlich aufgeführt) aus Hybridisierung II (s.Tab.21).

D. D I S K U S S I O N

Die bekannten Bakterienstämme mit Mureinen der Gruppe B sind aufgrund des G+C-Gehaltes ihrer DNA zwei Verwandtschaftsbereichen zuzuordnen:

1. Die Organismen mit hohem G+C-Gehalt der DNA (72 bis 77 %), die "B-Typ-Coryneformen", gehören dem "Actinomyceten-Ast" des 16S-rRNA-Stammbaumes an,
2. die Organismen mit niedrigem G+C-Gehalt der DNA (39 bis 48 %) (cf.Tanner et al., 1981), dem "Clostridien-Ast" (siehe Einleitung).

Acetobacterium woodii, Clostridium barkeri und E.limosum - d.h. alle bekannten B-Typ-Organismen mit niedrigem G+C-Gehalt der DNA außer Erhusiopathiae - wurden mithilfe der 16S-rRNA-Partialsequenzierung untersucht (Tanner et al., 1981). Die Höhe ihrer gemeinsamen S_{AB}-Werte (o.66 bis o.54) spricht für ihre Zusammenfassung auf dem taxonomischen Niveau einer Familie. Die Zugehörigkeit von Erhusiopathiae zu dieser

Gruppe erscheint aufgrund der Basenzusammensetzung seiner DNA (siehe Tab.6) und der Primärstruktur seines Mureins (siehe Tab.3) durchaus möglich. Numerisch-taxonomische Studien stellen diesen Organismus jedoch in den Verwandtschaftsbereich von Streptokokken und Laktobazillen (Davis et al., 1969; Jones, 1975; Wilkinson und Jones, 1977). In diese Untersuchungen wurden allerdings Acetobacterium woodii, Clostridium barkeri oder E.limosum nicht mit einbezogen. Zur Aufklärung der definitiven taxonomischen Stellung von Er rhusiopathiae wären weitere Untersuchungen auf genetischer Basis wünschenswert.

Von den über 3o bekannten B-Typ-Organismen mit hohem G+C-Gehalt der DNA wurden dagegen nur an M.lacticum, C.betae und C.mediolanum 16S-rRNA-Katalogisierungen vorgenommen (Stackebrandt et al., 198ob). Die S_{AB}-Werte von o,73 bis o,64 weisen auf die Zugehörigkeit dieser drei Organismen zu einer gemeinsamen Gattung hin, welche gegenüber den verwandten Genera Arthrobacter, Cellulomonas, Micrococcus und Brevibacterium durch S_{AB}-Werte von o,61 bis o,65 abgegrenzt ist. Die Anzahl der untersuchten B-Typ-Coryneformen ist dabei jedoch zu gering, um eine allgemeingültige Aussage über die taxonomische Struktur der gesamten Gruppe zu erlauben. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt auf der Basis von 3o beschriebenen B-Typ-Coryneformen und drei Molkereiabwasser-Isolaten, die willkürlich aus einer Gruppe von 28 Stämmen mit Mureinen der Gruppe B ausgewählt worden waren.

Über die Artzugehörigkeit der untersuchten B-Typ-Organismen gibt die DNA/DNA-Hybridisierung Aufschluß (C.5.3.). Nach Brenner (1973) gehören Organismen mit mindestens 7o % DNA-Homologie untereinander (bei 25 bis 3o^{o}C unter T_m) einer "Geno-Spezies" (Crombach, 1978) an. Homologiewerte in dieser Höhe werden bei folgenden Stämmen gefunden:

1. C.betae DSM 2o141, C.flaccuumfaciens DSM 2o129, C.flaccuumfaciens var. aurantiacum DSM 2o135, C.oortii ATCC 25283 und C.poinsettiae DSM 2o149 (Gruppe IV, Tab.13),
2. C.insidiosum DSM 2o157 und C.michiganense DSM 2o134, ATCC445o und ATCC 7429 (Gruppe VI, Tab.11 und 15),
3. M.lacticum DSM 2o427 und dem Molkereiabwasser-Isolat E 36/1 (Gruppe I, Tab.12).

Das bedeutet, daß diese Organismen jeweils als Stämme oder Subspezies einer Art anzusprechen sind.

Als Hinweis auf die enge Verwandtschaft dieser Stämme kann bereits die geringe Schwankungsbreite des prozentualen G+C-Gehalts ihrer DNA angesehen werden. Sie liegt noch unter dem maximalen Wert von 3 %, den Starr et al. (1975) für Stämme derselben Art fordern: Die Mol-% G+C variieren bei der Gruppe um C.flaccuumfaciens von 72,2 bis 73,7 %, C.insidiosum weist mit 76,1 % einen um 1,9 % höheren G+C-Gehalt der DNA auf als C.michiganense, bei M.lacticum und E 36/1 differiert der G+C-Gehalt um o,5 % (74,9 bzw. 75,4 %).

Die große Ähnlichkeit der unter 1. und 2. aufgeführten Organismengruppen wurde auch von anderen Autoren erkannt. So stellten Starr et al. (1975) anhand von DNA/DNA-Hybridisierungen an pflanzenpathogenen Corynebakterien die Zugehörigkeit von C.insidiosum, C.michiganense, C.tritici und C. sepedonicum sowie von C.poinsettiae, C.flaccuumfaciens und C.betae zu jeweils einer Gruppe mit hohem Verwandtschaftsgrad fest. Dabei arbeiteten die Autoren allerdings unter extrem restriktiven Reaktionsbedingungen (14 bis 18°C unter T_m) und mit anderen Stämmen, als in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Auch numerisch-taxonomische Untersuchungen unterstützen diesen Befund. Dye und Kemp (1977) ordnen C.flaccuumfaciens, C.betae, C.oortii und C.poinsettiae derselben Spezies zu; C.insidiosum und C.michiganense sind nach ihren Befunden Angehörige einer Art, in welche auch C.nebraskense und C.sepedonicum eingeordnet werden. Darüberhinaus sind auch C.iranicum und C.tritici einzubeziehen, die in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht wurden.

Organismen, die untereinander weniger als 7o % DNA-Homologie aufweisen, sind als eigene Arten anzusprechen. Dies trifft für 25 der 33 untersuchten Stämme zu.

Eng verwandte Spezies sind B.testaceum DSM 2o166 und das Molkereiabwasser-Isolat E 37/4 mit 58 % DNA-Homologie (Tab.14). Große Ähnlichkeit zeigen bemerkenswerterweise auch die aus Pflanzen isolierten Vertreter innerhalb der Gruppen IV und VI. Die DNA von B.citreum ATCC 15828, B.luteum ATCC 1583o und B.pusillum ATCC 19o96 (dieser Organismus wurde aus Ölschlamm isoliert) und der Vertreter der Gruppe um C. flaccuumfaciens DSM 2o129 (Gruppe IV) ist durchschnittlich zu 5o % homolog (Tab.13). Für C.michiganense DSM 2o134, C.insidiosum DSM 2o157, C.sepedonicum NCPPB 378 und C. nebraskense DSM2o4oo (Gruppe VI) wurden 39 bis 56 % DNA-Homologie ermittelt.

Cluster mit niedrigen, aber immer noch signifikanten DNA-Homologiewerten sind innerhalb der Gruppen V (Tab.14) und VI (Tab.15) zu finden. B.albidum CCM 2296, B.saperdae DSM 2o169, B.insectiphilum Bhat 146, M.liquefaciens Robinson 15 und der coryneforme Organismus DSM 2o143 (Gruppe V), die sich durch den Besitz der akzessorischen Zellwandkomponente Gal-NH_2 auszeichnen (Tab.5), weisen untereinander DNA-Homologien zwischen 21 und 39 % auf. A.terregens ATCC 13345

- der einzige als Arthrobacter klassifizierte B-Typ-Coryneforme - zeigt durchschnittlich 25 % DNA-Homologie zu B.testaceum DSM 2o166 und dem Isolat E 37/4 (Gruppe V).

In der Gruppe VI finden sich DNA-Homologiewerte von 21 bis 27 % zwischen C.aquaticum DSM 2o146, C.mediolanum DSM 2o152 und Ag.ramosus DSM 43o45. Wie in der Einleitung angeführt, wurde Ag.ramosus in seiner Erstbeschreibung - hauptsächlich aufgrund seiner Morphologie - als intermediäre Form zwischen Actinomyceten und Nocardien angesehen. Durch die DNA/DNA-Hybridisierungen ist seine Zugehörigkeit zur Gruppe der B-Typ-Coryneformen eindeutig erwiesen. Dieses Ergebnis verdeutlicht, daß morphologische Merkmale von Bakterien nicht uneingeschränkt Rückschlüsse auf deren Taxonomie erlauben, was auch am Beispiel der Micrococcaceae (Stackebrandt und Woese, 1979) sowie der großen Ähnlichkeit von Oerskovia und Cellulomonas (Stackebrandt et al., 198oa) aufgezeigt wurde.

Während DNA-Homologien von loo bis 37 % nur zwischen Organismen mit demselben Mureintyp auftreten, finden sich Werte von lo bis 34 % auch zwischen Vertretern mit unterschiedlichen Mureintypen (Tab.16). 18 bis 34 % DNA-Homologie wurde zwischen M.lacticum DSM 2o427, C.laevaniformans DSM 2o14o, B.imperiale ATCC 8365, C.barkeri DSM 2o145, B.saperdae DSM 2o169, B.insectiphilum Bhat 146, M. liquefaciens Robinson 15, dem Stamm DSM 2o143 und B.testaceum DSM 2o166 gefunden, d.h. zwischen Organismen der Gruppen I, II und V (im Einzelnen nicht tabellarisch aufgeführt). - Eine gemeinsame Eigenschaft der Mureine dieser Stämme ist der partielle Ersatz der Glutaminsäure in Position 2 der Peptiduntereinheit durch Hydroxyglutaminsäure (siehe C.1.2.). In den Zellwandpräparationen von C.barkeri und B.testaceum konnte allerdings keine Hydroxylierung der Glutaminsäure

nachgewiesen werden. Um die taxonomische Bedeutung dieses Merkmals abzusichern, wäre seine gründliche biochemische Chrakterisierung wünschenswert.

Außerhalb der GruppenI, II und V werden zwischen Organismen mit verschiedenem Mureintyp in der Regel 1o bis 2o % DNA-Homologie gefunden (Tab.16). Aber auch zwischen Vertretern derselben Murein-Primärstruktur treten derart geringe Genomähnlichkeiten auf (Gruppe VI, Tab.15).

In diesem Bereich der niedrigen DNA-Homologiewerte erwiesen sich die Übergänge zwischen B- und A-Typ-Coryneformen bemerkenswerterweise als fließend. Während C.bovis ATCC 13722 zu allen anderen untersuchten Stämmen mit Mureinen der Gruppe B nur zwischen 8 und 15 % DNA-Homologie zeigte, bewegten sich die DNA-Homologiewerte zwischen B-Typ-Coryneformen und drei Stämmen der gut definierten Gattung Cellulomonas (Stackebrandt und Kandler, 1979) nur geringfügig niedriger, in einer Spanne von 7 bis 13 % (3o Werte) (Tab.16).

Demnach konnte die Frage, ob alle untersuchten B-Typ-Coryneformen eine geschlossene Gruppe bilden, mithilfe der DNA/DNA-Hybridisierungen nicht beantwortet werden.

Die Abgrenzung dieser Organismen gegenüber den Cellulomonaden und die Kohärenz aller B-Typ-Coryneformen konnte jedoch durch die Ergebnisse der DNA/rRNA-Hybridisierungen aufgezeigt werden (C.7.3.). Wie unter C.7.3.4. erörtert, gehören alle untersuchten B-Typ-Organismen einer "RNA-Superfamily" an. Auch C.bovis, dessen taxonomische Position aufgrund der DNA-Homologiewerte nicht befriedigend geklärt werden konnte, ist dieser Gruppe zuzuordnen. Die zum Vergleich mituntersuchten Cellulomonaden können jedoch eindeutig aus dem Cluster

der ihnen nah verwandten B-Typ-Coryneformen ausgeschlossen werden. - Außerdem verdeutlichen die Ergebnisse der DNA/rRNA-Hybridisierungen auch die überdurchschnittliche Ähnlichkeit zwischen Vertretern der Gruppen I, II und V (Abb.17), die sich bereits durch DNA-Homologiewerte von 18 bis 37 % ausdrückt.

Die vorliegenden Daten über die Genom- bzw. rRNA-Cistron-Ähnlichkeit der B-Typ-Coryneformen - zusammen mit den 16S-rRNA-Katalogisierungen an M.lacticum, C.betae, C.mediolanum und anderen coryneformen Organismen (Stackebrandt et al., 1981b) - bestätigen die Hypothese, die basierend auf der Primärstruktur ihres Mureins aufgestellt wurde: Alle B-Typ-Coryneformen bilden eine Gruppe untereinander verwandter Organismen, die gegenüber den coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe A abgegrenzt ist.

Dabei tritt die Ausbildung von Mureinen der Gruppe B (soweit bekannt) erst verhältnismäßig spät während der Evolution der grampositiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt der DNA auf. (Als Maßstab für den zeitlichen Ablauf der phylogenetischen Entwicklung kann die Skala der S_{AB}-Werte - 0 bis 1,0 - dienen (Stackebrandt, 1980)). Der niedrigste gemeinsame S_{AB}-Wert, der zwischen B-Typ-Coryneformen bestimmt wurde, beträgt 0,64 (Stackebrandt et al., 1980b). Unbahängig davon wurden Mureine der Gruppe B zu entwicklungsgeschichtlich früherer Zeit (kleinster gemeinsamer S_{AB}-Wert: 0,54 (Tanner et al., 1981)) bei grampositiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt der DNA ausgebildet.

Die Befunde stehen im Gegensatz zu der Vorstellung von Schleifer und Kandler (1972) über die Phylogenie der Bakterien mit Mureinen der Gruppe B, wonach die Organismen mit Mureinen der Untergruppen B1 und B2 zwei getrennten

phylogenetischen Entwicklungslinien zugeordnet werden. Die Unterscheidung dieser Untergruppen basiert auf der Konfiguration der Diaminosäure in der Interpeptidbrücke: B1-Mureine zeichnen sich durch eine L-Diaminosäure aus, deren α-Aminogruppe zur Glutaminsäure in Position 2 der Peptiduntereinheit orientiert ist. B2-Mureine besitzen eine D-Diaminosäure in der Interpeptidbrücke, deren ω-Aminogruppe mit der Glutaminsäure verknüpft ist - entweder direkt oder durch Zwischenschaltung von Glycin.

Für die B-Typ-Coryneformen wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß eine Clusterbildung der Organismen mit B1- bzw. B2-Mureinen nicht auftritt. Die größte Ähnlichkeit, die zwischen Vertretern mit verschiedenen Mureintypen vorkommt, i.e. 18 bis 34 % DNA-Homologie, wurde zwischen Stämmen der Gruppen I und II (B1-Mureine) und der Gruppe V (B2-Murein) ermittelt. Dagegen wurden sogar bei Organismen mit demselben Mureintyp (bes.innerhalb Gruppe VI) und in der Regel zwischen Stämmen mit verschiedenen Mureintypen derselben Untergruppen deutlich niedrigere Ähnlichkeiten festgestellt. So zeigt C.bovis zu den anderen Vertretern mit Mureinen der Untergruppe B1 (Gruppen I und II) nur 8 bis 13 % DNA-Homologie; die Organismen mit unterschiedlichen Mureintypen der Untergruppe B2 (Gruppen IV, V und VI) weisen untereinander stets nur 1o bis 2o % DNA-Homologie auf.

Darüberhinaus kann auch der hohe S_{AB}-Wert von o,81 zwischen M.lacticum (B1) und einem Eigenisolat von Dr.C.R.Woese (Dept.of Genetics and Development, University of Illinois, Urbana) als Beispiel für die unerwartet hohe Ähnlichkeit zwischen Organismen mit B1- und B2-Mureinen gewertet werden. Das Murein dieses Eigenisolats weist die Aminosäurezusammensetzung der Gruppe V auf, wonach angenommen werden kann, daß es der Untergruppe B2 angehört (Stackebrandt, pers.Mitteilung).

Als Beispiel eines S_{AB}-Wertes zwischen Organismen, die nachweislich Mureine derselben Untergruppe (B2) besitzen, liegt für C.betae (Gruppe IV) und C.mediolanum (Gruppe VI) S_{AB} = o,73 vor. Die S_{AB}-Werte zwischen diesen beiden Organismen und M.lacticum (B1) betragen allerdings im Durchschnitt nur o,69 (Stackebrandt et al. 198ob), was für sich allein betrachtet die oben erwähnte Hypothese von Schleifer und Kandler (1972) stützt.

Die Differenzierung der Mureine der Gruppe B aufgrund bestimmter Merkmale ihrer Primärstruktur spiegelt also bei den B-Typ-Coryneformen keine taxonomischen Gruppierungen wider. Stämme derselben Spezies, mit mindestens 7o % DNA-Homologie, besitzen stets denselben Mureintyp, und auch nah verwandte Arten - bis hinunter zu 37 % DNA-Homologie - weisen immer dieselbe Murein-Primärstruktur auf. Vertreter desselben Mureintyps können jedoch auch auf dem untersten Ähnlichkeitsniveau, das innerhalb der Gruppe gefunden wurde, nämlich lo bis 2o % DNA-Homologie, miteinander verwandt sein.

Nachdem der Befund erhoben wurde, daß die B-Typ-Coryneformen eine verwandte, in sich geschlossenen Organismengruppe darstellen, ist noch deren taxonomischer Rang zu erörtern:

Wie oben erwähnt, wurde aufgrund der S_{AB}-Werte vom M.lacticum, C.betae und C.mediolanum (Durchschnitt: o,69) für die B-Typ-Coryneformen der Rang einer Gattung angenommen (Stackebrandt et al., 198ob), denn zwischen diesen Organismen und Vertretern der verwandten Gattungen Arthrobacter, Cellulomonas, Micrococcus und Brevibacterium ergaben sich deutlich niedrigere S_{AB}-Werte von o,61 bis o,65 (siehe Abb.2). Die vorliegenden Untersuchungen an DNA und rRNA von 33 Vertretern der Gruppe unterstützen diese Annahme und stellen sie auf eine breitere Grundlage.

Als Hinweis darauf, daß es sich bei der untersuchten Organismengruppe um eine Gattung handelt, dient bereits die niedrige Schwankungsbreite von 5 % G+C-Gehalt der DNA, die für die B-Typ-Coryneformen gemessen wurde. Mit Ausnahme von 7o,5 % G+C der DNA des Molkereiabwasser-Isolats S 11o treten Werte zwischen 72 und 77 Mol-% G+C auf. Dieser Differenzbereich ist mehrfach innerhalb von Gattungen gefunden worden (Stanier et al., 1976; Gillis und De Ley, 198o). Starr et al. (1975) schlagen für die maximale Variationsbreite innerhalb eines Genus sogar 9 % vor.

Die endgültige Bestätigung, daß die B-Typ-Coryneformen in einer Gattung zusammenzufassen sind, liefern jedoch erst die $\Delta T_{m(e)}$-Werte der DNA/rRNA-Hybridisierungen. Innerhalb der Gattungen gramnegativer Organismen, die die Arbeitsgruppe von De Ley mit Hilfe von DNA/rRNA-Hybridisierungen definierte, beträgt der maximale $\Delta T_{m(e)}$ 5,5°C (De Ley et al., 1978). Für Gattungen grampositiver Organismen wurden folgende durchschnittliche $\Delta T_{m(e)}$-Werte bestimmt: für Staphylococcus 5,3° (Kilpper, 198o), für Actinoplanes ebenfalls 5,3°, Streptomyces 6,3° und Streptosporangium 7,6° (Stackebrandt et al., 1981). Der durchschnittliche $\Delta T_{m(e)}$, der von 52 verschiedenen DNA/rRNA-Hybridspezies mit DNA_F und rRNA von B-Typ-Coryneformen errechnet wurde, beträgt 4,8°C, wobei sich die berücksichtigten $\Delta T_{m(e)}$-Werte über einen Bereich von 1,5 bis 7,o°C erstrecken. (Die Werte der DNA/rRNA-Hybride, deren DNA von Organismen stammt, die loo bis 7ö % DNA-Homologie zu dem Stamm aufweisen, aus dem jeweils die rRNA isoliert worden war, wurden bei dieser Berechnung nicht berücksichtigt.) Der verhältnismäßig große $\Delta T_{m(e)}$-Wert von 7°C wurde für DNA/rRNA-Hybride bestimmt, an denen Nukleinsäure von C.bovis beteiligt ist, jedoch ebenso für das Hybrid DNA (B.citreum)/RNA (M.lacticum) (siehe Tab.21 und Legende zu Tab.23).

Die Gattung der B-Typ-Coryneformen enthält nach den vorliegenden Untersuchungen Organismen, die ursprünglich fünf verschiedenen Genera zugeordnet waren: Corynebacterium (16 Vertreter), Brevibacterium (9 Vertreter), Microbacterium (2 Vertreter), Arthrobacter und Agromyces (jeweils 1 Vertreter). Die taxonomische Struktur der physiologisch und morphologisch relativ heterogenen Gattung ist in Abb.21 in Form eines Dendrogamms, basierend auf den DNA-Homologiewerten, dargestellt.

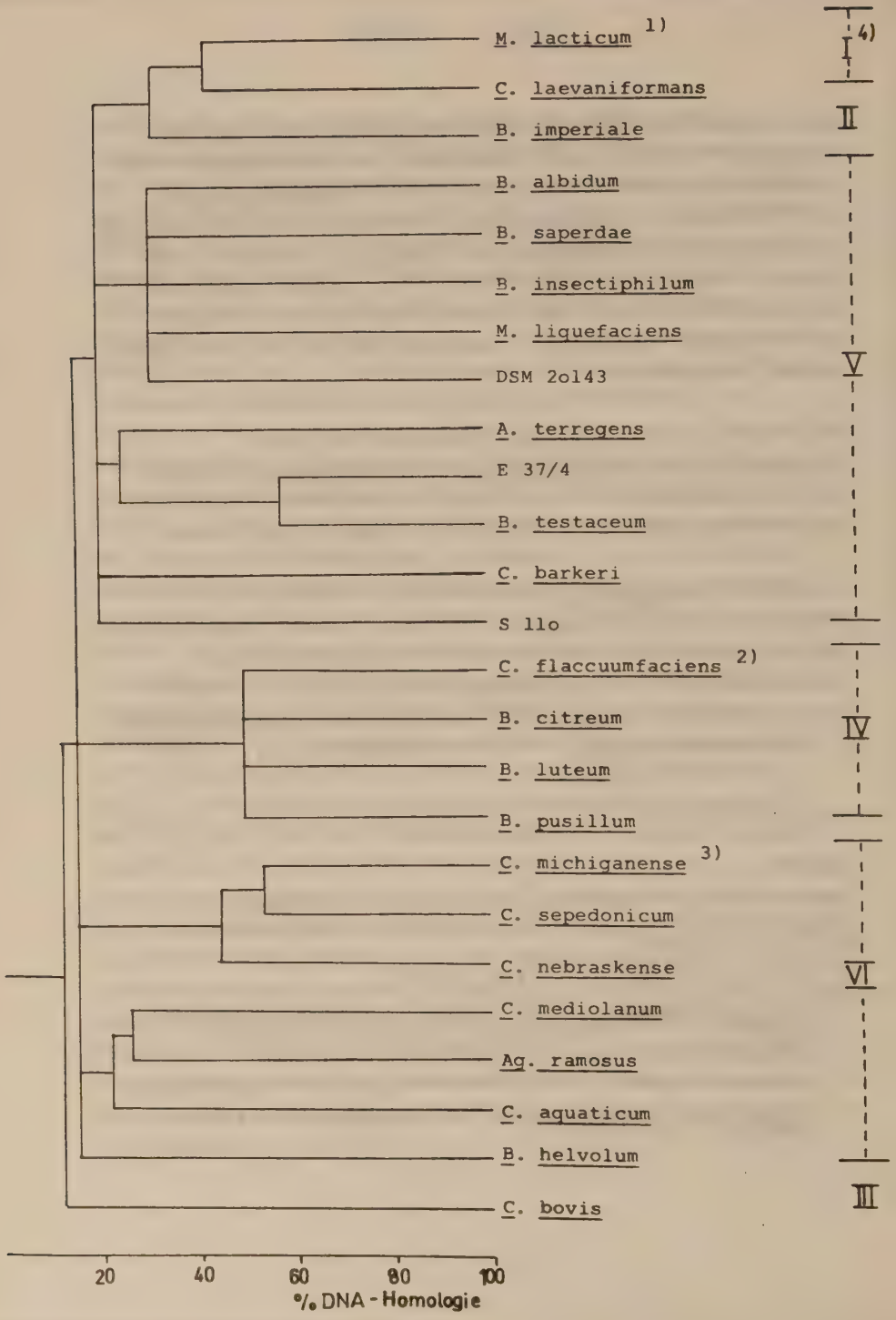
Es erhebt sich die Frage der Benennung des Genus. Corynebacterium, Brevibacterium oder Arthrobacter kommen als Gattungsnamen nicht in Frage, da sie bereits definierte Organismengruppen mit Mureinen der Gruppe A bezeichnen.

Das Genus Corynebacterium Lehmann und Neumann, 1896 ist durch mDAP-direkt-quervernetztes Murein sowie Arabinogalactan und Mycolsäuren als akzessorische Zellwandkomponenten charakterisiert (vergl.Stanier et al., 1976). Als essentielle Merkmale eines neu definierten Genus Brevibacterium - mit Typstamm B.linens - schlagen Fiedler et al. (1981)

Abb.21:

Dendrogramm zur taxonomischen Struktur des Genus der B-Typ-Coryneformen auf der Grundlage der ermittelten DNA-Homologiewerte.

1) Stämme DSM 2o427 und Seiler E 36/1
2) C.flaccuumfaciens als Vertreter der Gruppe C.flaccuumfaciens, C.f.var.aurantiacum, C.betae, C.oortii und C.poinsettiae
3) Stämme DSM 2o134, ATCC 445o, ATCC 7429 und C.insidiosum
4) I bis VI: Gruppierung der Stämme ihrem Mureintyp entsprechend (siehe Tab.3)


M. lacticum 1)
C. laevaniformans
B. imperiale
B. albidum
B. saperdae
B. insectiphilum
M. liquefaciens
DSM 2o143
A. terregens
E 37/4
B. testaceum
C. barkeri
S 11o
C. flaccuumfaciens 2)
B. citreum
B. luteum
B. pusillum
C. michiganense 3)
C. sepedonicum
C. nebraskense
C. mediolanum
Ag. ramosus
C. aquaticum
B. helvolum
C. bovis
I 4)
II
V
IV
VI
III
20
40
60
80
100
% DNA - Homologie

m-DAP-direkt-quervernetztes Murein, Fehlen von Mycolsäuren und Arabinogalactan und als dominierendes Charakteristikum den Besitz von Teichonsäuren vor. Für die Gattung Arthrobacter Conn und Dimmick,1947 können als taxonomische Merkmale auf biochemischer Grundlage angesehen werden: Mureine der Gruppe A mit Lysin in Position 3 der Peptiduntereinheit und verschiedenen Aminosäuren in der Interpeptidbrücke, sowie Fehlen der akzessorischen Zellwandkomponenten Arabinose, Teichonsäuren und Mycolsäuren (Fiedler, 1971; Yamada und Komagata, 1972; Keddie und Cure, 1977; Stackebrandt und Fiedler, 1979; Fiedler, pers.Mitteilung).

Weiterhin wäre es nicht sinnvoll, die Gattung nach Agromyces ramosus Gledhill und Casida,1969 zu benennen, da dieser Organismus morphologisch (siehe Einleitung) und physiologisch (Katalase-negativ (Gledhill und Casida, 1969)) einen Außenseiter der Gruppe darstellt. Es verbleiben somit die Namen Microbacterium Orla-Jensen,1919 und Curtobacterium Yamada und Komagata,1972 zur Benennung der Gattung coryneformer Bakterien mit Mureinen der Gruppe B.

Der Name Curtobacterium wurde von Yamada und Komagata (1972) für coryneforme Organismen eingeführt, die - neben anderen Merkmalen (siehe Einleitung) - als charakteristische Aminosäuren der Zellwand Ornithin besitzen. Der Unterschied zu den Cellulomaden (mit ebenfalls "ornithinhaltiger Zellwand") besteht in etwas niedrigerem G+C-Gehalt der DNA sowie langsamerer und schwächerer Säureproduktion aus einer geringeren Anzahl verwertbarer Zucker. Das Merkmal "Mureine der Gruppe B" berücksichtigen die Autoren in ihrem Klassifizierungsschema nicht. Die untersuchten B-Typ-Coryneformen mit DAB-haltigem Murein wurden ebenfalls in

einem eigenen Genus (ohne Namengebung) zusammengefaßt; eine Reihe weiterer Stämme mit Mureinen der Gruppe B - deren "Hauptaminosäure der Zellwand" teilweise falsch bestimmt worden war - konnten in keine der aufgestellten Gruppen eingeordnet werden.

Die erhobenen Befunde zeigen jedoch auf, daß die coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe B nicht mehreren, sondern nur einer einzigen Gattung angehören. Die Beibehaltung des Namens Curtobacterium für die B-Typ-Coryneformen würde demnach eine neue, erweiterte Beschreibung dieser Gattung erforderlich machen. Nach den Regeln des "International Code of Nomenclature of Bacteria" (Lapage et al., 1975) hat jedoch der Gattungsname Microbacterium Orla-Jensen, 1919 Vorrang vor Curtobacterium Yamada und Komagata, 1972.

Orla-Jensen (1919) führte Microbacterium als vorläufigen Namen für eine Bakteriengruppe ein, die sich gegenüber anderen stäbchenförmigen Milchsäurebakterien durch die geringe Größe ihrer Zellen auszeichnete. Ihr Unterschied zu den Corynebakterien besteht in ungewöhnlicher Hitzeresistenz und Produktion von L(+)-Milchsäure aus Glucose.

In Bergey's Manual (8.Ausgabe, 1974) werden gegenwärtig vier Spezies der Gattung Microbacterium geführt: M.lacticum, M.liquefaciens, M.flavum und M.thermosphactum. Dabei ist nach neueren biochemischen Untersuchungen jedoch nur M.liquefaciens näher mit M.lacticum verwandt, welches von Orla-Jensen (1919) als Typspezies des Genus eingesetzt wurde.

Für M.flavum wird von Rogosa et al. (1974) der Transfer in die Gattung Corynebacterium vorgeschlagen. Diese Umbenennung ist gerechtfertigt aufgrund des G+C-Gehalts der DNA von 58 % (Collins-Thompson et al., 1972) sowie durch den

Besitz von m-DAP-direkt-quervernetztem Murein (Schleifer, 197o), Arabinogalactan (Keddie und Cure, 1977) und Mycolsäuren vom Typ C.diphtheriae (Goodfellow et al., 1976).

M.thermosphactum wurde von Sneath und Jones (1976) als Brochothrix thermosphacta versuchsweise der Familie Lactobacillaceae zugeordnet. Aufgrund der Basenzusammensetzung seiner DNA von 36 % G+C (Collins-Thompson et al., 1972) und seines m-DAP-direkt-quervernetzten Mureins (Schleifer, 197o) ist eine Verwandtschaft dieses Organismus mit M.lacticum mit Sicherheit auszuschließen.

Als Typspezies des Genus Microbacterium, wie es durch die vorliegende Arbeit definiert wird, ist M.lacticum Orla-Jensen, 1919 vorzuschlagen. Während die Beschreibung dieses Organismus durch Orla-Jensen auf Hitzeresistenz, optimaler Wachstumstemperatur, Fähigkeit zur Caseinhydrolyse und Vergärung verschiedener Zucker sowie auf der Morphologie beruht, ist das neue Genus Microbacterium nun genetisch/biochemisch zu charakterisieren:

1. Der G+C-Gehalt der DNA bewegt sich zwischen 72 und 77 %.
2. Als charakteristische Membranlipide kommen anteiso-C_{15}- und -C_{17}- sowie iso-C_{16}-Fettsäuren und Menachinone mit ausschließlich unhydrierten Polyprenylresten vor (Yamada et al., 1976; Collins et al., 1979, 198o; Collins und Jones, 198o).
3. In den Zellwänden finden sich keine Teichonsäuren, kein Arabinogalactan und keine Mycolsäuren (Fiedler, pers. Mitteilung; Goodfellow et al., 1976; Keddie und Cure, 1977).

4. Die Mureine gehören der Gruppe B (Schleifer und Kandler, 1972) an. Die Quervernetzung der Peptiduntereinheiten erfolgt dabei von der Glutaminsäure in Position 2 des Tetrapeptids aus; Glycin findet sich stets an erster, L-Homoserin, L-Lysin oder L-DAB an dritter Position der Peptiduntereinheit; in der Interpeptidbrücke kommt (teilweise neben Glycin) L-Lysin, L-DAB, D-Ornithin oder D-DAB vor (Fiedler et al., 197o; Fiedler und Kandler, 1973; Fiedler, pers.Mitteilung).

In Tab.24 sind die bekannten Organismen aufgeführt, die der Gattung Microbacterium angehören, wie sie aufgrund der Untersuchungen an DNA und 23S-rRNA sowie biochemischer Daten definiert wird.

Tab.24: Stämme der Gattung Microbacterium

1) Abkürzungen und genaue Angaben der Herkunft siehe Tab.2

2) Aufgrund der von Lapage et al. (1975) herausgegebenen Prioritätsregeln der Namengebung sind die ursprünglich als jeweils eigene Arten der Gattung Corynebacterium beschriebenen pflanzenpathogenen Organismen nach C.flaccuumfaciens Hedges, 1922, Dowson, 1942 comb.nov. bzw. C.michiganense Smith, 191o zu benennen (vergl. Dye und Kemp, 1977).

3) DNA-Homologiewerte liegen für diesen Organismus nicht vor. Ein DAB-haltiges Murein und ausschließlich unhydrierte Menachinone (Collins und Jones, 198o) sprechen für die Eingliederung in das Genus Microbacterium. Unterstützende Daten liefern numerisch-taxonomische Untersuchungen (Dye und Kemp, 1977; Seiler, unveröffentlicht).

4) Aufnahme in das Genus Microbacterium aufgrund der DNA-Homologiewerte von Starr et al., (1975), der numerisch-taxonomischen Untersuchungen von Dye und Kemp (1977) ...

5) ... und der qualitativen Aminosäurezusammensetzung des Mureins (Perkins und Cummins, 1964).

Organismus	Stammbezeichnung [1]
Microbacterium	
albidum	CCM 2296
aquaticum	DSM 2o146 = ATCC 14665
barkeri	DSM 2o145 = ATCC 15954
bovis	ATCC 13722
citreum	ATCC 15828
flaccuumfaciens [2]	
subsp. betae	DSM 2o141 = ATCC 13437
" flaccuumfaciens	DSM 2o129 = ATCC 6887
" flaccuumfaciens	DSM 2o135 = ATCC 12813
" oortii	ATCC 25283
" poinsettiae	DSM 2o149 = ATCC 9682
helvolum	ATCC 13715
imperiale	ATCC 8365
insectiphilum	Bhat 146
iranicum [3]	NCPPB 2253
lacticum	DSM 2o427 = ATCC 818o
lacticum	Seiler E 36/1
laevaniformans	DSM 2o141 = ATCC 15953
liquefaciens	Robinson 15
luteum	ATCC 1583o
mediolanum	DSM 2o152 = ATCC 14oo4
michiganense [2]	
subsp. insidiosum	DSM 2o157 = ATCC 1o253
" michiganense	DSM 2o134 = ATCC 1o2o2
" michiganense	ATCC 445o
" michiganense	ATCC 7429
nebraskense	DSM 2o4oo
pusillum	ATCC 19o96
ramosum	DSM 43o45 = ATCC 25173
saperdae	DSM 2o169 = ATCC 19272
sepedonicum	NCPPB 378
terregens	ATCC 13345
testaceum	DSM 2o166 = ATCC 15829
tritici	ATCC 114o3 [4] NCPPB 471 [5]
spec.	DSM 2o143
"	Seiler E 37/4
"	Seiler 11o

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

An 3o definierten Sammlungsstämmen und drei Eigenisolaten coryneformer Bakterien mit Mureinen der Gruppe B wurden nach Bestimmung des G+C-Gehalts der DNA DNA/DNA- und DNA/rRNA-Hybridisierungen durchgeführt, mit dem Ziel, die Verwandtschaftsverhältnisse der Organismen aufzuklären.

Die DNA-Homologiewerte, die zwischen B-Typ-Coryneformen gefunden wurden, bewegen sich im Bereich von 8 bis loo %.

Organismen mit loo bis 7o % DNA-Homologie sind als Stämme oder Subspezies einer Art anzusehen; ihre Mureine weisen jeweils dieselbe Primärstruktur auf. Dies gilt für :

1. C.flaccuumfaciens ATCC 6887, C.flaccuumfaciens var. aurantiacum ATCC 12813, C.betae ATCC 13437, C.oortii ATCC 15183 und C.poinsettiae ATCC 9682.

2. C.michiganense ATCC 1o2o2, ATCC 445o, ATCC 7429 und C.insidiosum ATCC 1o253.
3. M.lacticum ATCC 818o und das Molkereiabwasser-Isolat E 36/1.

Alle anderen untersuchten Organismen sind als getrennte Arten anzusprechen. Unter ihnen finden sich hohe Genomähnlichkeiten von 37 bis 7o % DNA-Homologie nur unter den folgenden Vertretern mit jeweils demselben Mureintyp :

1. M.lacticum ATCC 818o und C.laevaniformans ATCC 15953,
2. B.citreum ATCC 15828, B.luteum ATCC 1583o, B.pusillum ATCC 19o96 und der Gruppe von C.flaccuumfaciens,
3. B.testaceum ATCC 15829 und dem Molkereiabwasser-Isolat E 37/4,
4. C.sepedonicum NCPPB 378, C.nebraskense DSM 2o4oo und der Gruppe von C.michiganense.

Zwischen Vertretern mit unterschiedlichem Mureintyp treten DNA-Homologiewerte von 8 bis 34 % auf. Dabei ist keine Clusterbildung von Organismen zu erkennen, die dieselbe Murein-Primärstruktur besitzen. Stämme mit verschiedenem Mureintyp zeigen teilweise höhere Verwandtschaft zueinander als Vertreter mit demselben Mureintyp. Eine Gruppenbildung der Organismen, deren Mureine den Untergruppen B1 bzw. B2 angehören, ist nicht festzustellen.

DNA/rRNA-Hybridisierungen beweisen, daß die coryneformen Bakterien mit Mureinen der Gruppe B, einschließlich Agromyces ramosus, als Gattung zusammenzufassen sind.

Das neue Genus wird aufgrund biochemischer Merkmale charakterisiert. Als Gattungsname wird Microbacterium Orla-Jensen, 1919 vorgeschlagen.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Back, W. und E.Stackebrandt (1978): DNS/DNS-Homologiestudien innerhalb der Gattung Pediococcus. Arch.Mikrobiol. 118, 79-85.

Balch, W.E., L.J.Magrum, G.E.Fox, R.S.Wolfe and C.R.Woese (1977a): An ancient divergence among the bacteria. J.Mol. Evol.9, 3o5-311.

Balch, W.E., S.Schoberth, R.S.Tanner, and R.S.Wolfe (1977b): Acetobacterium, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. Int. J.Syst.Bact 27, 355-361.

Bendich, A.J. and B.J.McCarthy (197o): Ribosomal RNA homologies among distantly related organisms. Proc.Nat.Acad. Sci.USA 65, 349-356.

Birnstiel, M.L., B.H.Sells and I.F.Purdom (1972): Kinetic complexity of RNA molecules. J.Mol.Biol.63, 21-39.

Bishop, D.H.L., J.R.Claybrook and S.Spiegelman (1967): Electrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacrylamide gels. J.Mol.Biol.26, 373-387.

Bonner, J., G.Kung, and L.Bekhor (1967): A method for the hybridization of nucleic acid molecules at low temperature. Biochemistry 6, 365o-3653.

Bonner, T.I., D.J.Brenner, B.R.Neufeld and R.J.Britten (1973): Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence. J.Mol.Biol.81, 123-135.

Bousfield, I.J. (1972): A taxonomic study of some coryneform bacteria. J.Gen.Microbiol. 71, 441-455.

Breed, R.S., E.G.D.Murray, and N.R.Smith -eds (1957): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ed.7, Williams and Wilkins, Baltimore.

Brenner, D.J., G.R.Fanning, F.J.Sherman and S.Falkow (1972a): Polynucleotide sequence divergence among strains of Escherichia coli and closely related organisms. J.Bact.1o9, 953-96o.

Brenner, D.J., G.R.Fanning, and A.G.Steigerwaldt (1972b): Deoxyribonucleic acid relatedness among species of Erwinia and between Erwinia species and other Enterobacteria. J.Bact.11o, 12-17.

Brenner, D.J. (1973): Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of enteric bacteria. Int.J.Syst.Bact.23, 298-3o7.

Britten, R.J. and D.E.Kohne (1968): Repeated sequences in DNA. Science 161, 529-54o.

Britten, R.J., D.E.Graham, and B.R.Neufeld (1974): Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. In: "Methods in Enzymology" Vol.29 E, pp. 363-4o5 (L.Grossmann, K.Moldave, eds) Academic Press, New York, London.

Brosius, J., M.L.Palmer, P.J.Kennedy, and H.F.Noller (1978): Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli. Proc.Natl.Acad. Sci.USA 75, 48o1-48o5.

Buchanan, R.E. and N.E.Gibbons - eds (1974): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ed.8, Williams and Wilkins, Baltimore.

Buhl, U. (198o): DNS/rRNS-Hybridisierungen mit Peptokokken und Staphylokokken. Zulassungsarbeit; Technische Universität, München.

Burnham, B.F. and J.B.Neilands (1961): Studies on the metabolic function of the ferrichrome compounds. J.Biol. Chem. 236, 554-559.

Burton, K. (1968): Determination of DNA concentration with diphenylamine. In: "Methods in Enzymology", Vol.XII B pp. 163-166. (L.Grossman and K.Moldave, eds.) Academic Press, New York - London.

Carbon, P., C.Ehresmann, B.Ehresmann, and J.P.Ebel (1978): The sequence of Escherichia coli ribosomal 16S RNA determined by new rapid gel methods. FEBS Letters 94, 152-156.

Church, R.B. and B.J.McCarthy (1968): Related base sequences in the DNA of simple and complex organisms. II. The interpretation of DNA/RNA hybridization studies with mammalian nucleic acids. Biochem.Genetics 2, 55-73.

Collins, M.D., M.Goodfellow and D.E.Minnikin (1979): Isoprenoid quinones in the classification of coryneform and related bacteria.J.Gen.Microbiol. 11o, 127-136.

Collins, M.D., M.Goodfellow and D.E.Minnikin (198o): Fatty acid, isoprenoid quinone and polar lipid composition in the classification of Curtobacterium and related taxa. J.Gen.Microbiol. 118, 29-37.

Collins, M.D. and D.Jones (198o): Lipids in the classification of coryneform bacteria containing peptidoglycans based on 2,4-DAB. J.Appl.Bacteriol. 48, 459-47o.

Collins-Thompson, D.L., T.Sørhaug, L.D.Witter and Z.J.Ordal (1972): Taxonomic consideration of Microbacterium lacticum, Microbacterium flavum and Microbacterium thermosphactum. Int.J.Syst.Bacteriol.22, 65-72.

Crombach, W.H.J. (1978): DNA base ratios and DNA hybridization studies of coryneform bacteria, Mycobacteria and Nocardia. In: "Coryneform Bacteria", pp. 161-18o (I.J.Bousfield and A.G.Callely, eds) Academic Press, London - New York - San Francisco.

Cummins, C.S. (1962): Chemical composition and antigenic structure of the cell walls of Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Actinomyces and Arthrobacter. J.Gen.Microbiol. 28, 35-5o.

Darby, G.K., A.S.Jones, J.F.Kennedy and R.T.Walker (197o): Isolation and analysis of the nucleic acids and polysaccharides from Clostridium welchii. J.Bact. 1o3, 159-165.

Davis, G.H.G., L.Fomin, E.Wilson and K.G.Newton (1969): Numerical taxonomy of Listeria, Streptococci and possibly related bacteria. J.Gen.Microbiol. 57, 333-348.

Davis, G.H.G. and K.G.Newton (1969): Numerical taxonomy of some named coryneform bacteria. J.Gen.Microbiol. 56, 195-214.

Denhardt, D.T. (1966): A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem.Biophys. Res.Commun. 23, 641-646.

Diaz-Mauriño, T. and H.R.Perkins (1974): The presence of acidic polysaccharides and muramic acid phosphate in the walls of Corynebacterium poinsettiae and Corynebacterium betae. J.Gen.Microbiol. 8o, 533-539.

Dische, Z. (1955): Color reaction of nucleic acid components. In: "The Nucleic Acids", 1 (E.Chargaff and J.N. Davidson, eds) Academic Press, New York.

Doi, R.H. and R.T.Igarashi (1965): Conservation of ribosomal and messenger ribonucleic acid cistrons in Bacillus species. J.Bact.9o, 384-39o.

Dye, D.W. and W.J.Kemp (1977): A taxonomic study of plant pathogenic Corynebacterium species. New Zealand Journal of Agricultural Research 2o, 563-582.

Echandi, E. and M.Sun (1973): Isolation and characterization of a bacteriophage for the identification of Corynebacterium michiganense. Phytopathology 63, 1398-14o1.

Faller, A. (198o): Untersuchungen zum Cytochrom-Muster bei Gram-positiven Kokken und coryneformen Bakterien. Dissertation; Technische Universität, München.

Fiedler, F., K.H.Schleifer, B.Cziharz, E.Interschick and O.Kandle (197o): Murein types in Arthrobacter, Brevibacteria, Corynebacteria and Microbacteria. Reports from the conference on the taxonomy of bacteria held in the Czechoslovak collection of microorganisms. J.E. Purkyne University Brno on september 24th-27th 1969, 111-122.

Fiedler, F. (1971): Aminosäuresequenz der Mureine der coryneformen Bakterien. Dissertation; Technische Universität, München,

Fiedler, F. und O.Kandler (1973): Die Aminosäuresequenz von 2,4-Diaminobuttersäure enthaltenden Mureinen bei verschiedenen coryneformen Bakterien und Agromyces ramosus. Arch.Mikrobiol. 89, 51-66.

Fiedler, F., M.Schäffler, and E.Stackebrandt (1981): Biochemical and nucleic acid hybridization studies on Brevibacterium linens and related strains. Arch. Microbiol. 129, 85-93.

Flavell, R.A., E.J.Birfelder, J.P.M. Sanders and P.Borst (1974a): DNA/DNA hybridization on nitrocellulose filters. I: General considerations and non-ideal kinetics. Eur.J.Biochem.47, 535-544.

Flavell, R.A., P.Borst and E.J.Birfelder (1974b): DNA/DNA hybridizations on nitrocellulose filters. II: Concatenation effects. Eur.J.Biochem.47, 545-548.

Flossmann, K.D. und W.Erler (1972): Serologische, chemische und immunologische Untersuchungen an Rotlaufbakterien. XI: Isolierung und Charakterisierung von DNS aus Rotlaufbakterien. Arch.f.exp.Vet.-Medizin 26, 817-824.

Gillespie, D. (1968): The formation and detection of DNA/RNA-hybrids. in: "Methods in Enzymology", Vol.XII B, pp. 641-668 (L.Grossmann and K.Moldave, eds). Academic Press, New York - London.

Gillespie, S. and D.Gillespie (1971): Ribonucleic acid - deoxyribonucleic acid hybridization in aqueous solutions and in solutions containing formamide. Biochem.J. 125, 481-487.

Gillis, M. and J.De Ley (198o): Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of Acetobacter and Gluconobacter. Int.J.Syst.Bacteriol. 3o, 7-27.

Gledhill, W.E. and L.E.Casida (1969): Predominant catalase-negative soil bacteria. III: Agromyces gen.n., microorganisms intermediary to Actinomyces and Nocardia. Appl.Microbiol. 18, 34o-349.

Goodfellow, M., M.D.Collins and D.E.Minnikin (1976): Thin-layer chromatographic analysis of mycolic acid and other long-chain components in whole-organism methanolysates of coryneform and related taxa. J.Gen.Microbiol.96, 351-358.

Gross, D.C. and A.K.Vidaver (1979): Bacteriocins of phytopathogenic Corynebacterium spezies. Can.J.Microbiol. 25, 367-374.

Guinand, M., J.M.Ghuysen, K.H.Schleifer and O.Kandler (1969): The peptidoglycan in walls of Butyribacterium rettgeri Biochemistry 8, 2oo-2o7.

Harbitz, I. and T.B.Øyen (1974): Study of a haploid yeast strain with an unusually high rDNA content. I: Comparison of hybridization levels after purification of the DNA by different methods. Biochem.Biophys.Acta 366, 374-384.

Harrington, B.J. (1966): A numerical taxonomical study of some Corynebacteria and related organisms. J.Gen. Microbiol. 45, 31-4o.

Holdeman, L.V. and W.E.C.Moore (1974): Genus Eubacterium; In Buchanan and Gibbons (1974).

Johnson, J.L. and E.J.Ordal (1968): DNA-homology in bacterial taxonomy: Effect of incubation temperature on reaction specifity. J.Bact.95, 893-9oo.

Johnson, J.L., R.S.Anderson and E.J.Ordal (197o): Nucleic acid homologies among oxidase-negative Moraxella species. J.Bact. 1o1, 568-573.

Johnson, J.L. and B.S.Francis (1975): Taxonomy of the Clostridia: Ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. J.Gen.Microbiol. 88, 229-244.

Jones, D. (1975): A numerical taxonomic study of coryneform and related bacteria. J.Gen.Microbiol. 87, 52-96.

Kandler, O. (197o): Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera Lactobacillus, Bifidobacterium, Leuconostoc and Pediococcus. Int.J.Syst.Bact.2o, 491-5o7.

Kandler, O. and S.Schoberth (1979): Murein structure of Aceto-bacterium woodii. Arch.Microbiol. 12o, 181-183.

Kandler, O. and K.H.Schleifer (198o): I. Systematics of Bacteria in: Progress in Botany 42, pp. 234-252 (H.Ellenberg, K.Esser, K.Kubitzki, E.Schnepf, and H.Ziegler, eds) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Katznelson, H. (1958): Metabolism of phytopathogenic bacteria. II: Metabolism of carbohydrates by cell-free extracts. J.Bact.75, 54o-543.

Keddie, R.M., B.G.S.Leask and J.M.Grainger (1966): A comparison from bacteria from soil and herbage: Cell wall composition and nutrition. J.Appl.Bact.29, 17-43.

Keddie, R.M. and G.L.Cure (1977): The cell wall composition and distribution of free mycolic acids in named strains of coryneform bacteria and in isolates from various natural sources. J.Appl.Bact.42, 229-252.

Keddie, R.M. and G.L.Cure (1978): Cell wall composition of coryneform bacteria; in: "Coryneform Bacteria" pp. 47-84 (I.J.Bousfield and A.G.Callely, eds) Academic Press, London.

Kennell, D.E. (1971): Principles and practices of nucleic acid hybridization. Progr.Nucl.Acid Res.Mol.Biol.11, 259-3o1.

Kilpper, R. (198o): Peptococcus saccharolyticus: Ein anaerober Staphylococcus. Dissertation; Technische Universität, München.

Kirby, K.S. (1957): A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: Evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. Biochim. J.66, 495-5o4.

Klement, Z. and B.Lovas (1959): Isolation and characterization of a bacteriophage for Corynebacterium flaccuumfaciens Phytopathology 49, 1o7-112.

Köster-Meißner, E. (1979): Versuche zur Charakterisierung der Polysaccharide in den Zellwänden verschiedener coryneformer Bakterien und Gaffkya homari mit besonderer Berücksichtigung von Teichuronsäuren. Zulassungsarbeit; Universität München.

Kotaka, T. and R.L.Baldwin (1964): Effects of nitrous acid on the dAT copolymer as a template for DNA polymerase. J.Mol.Biol.9, 323-339.

Lachance, R.A. (196o): The vitamin requirements of Corynebacterium sepedonicum. Can.J.Microbiol. 6, 171-174.

Lachance, R.A. (1962): The amino acid requirements of Corynebacterium sepedonicum. Can.J.Microbiol. 8, 321-325.

Laird, C.D., L.McConaughy and B.J.McCarthy (1969): Rate of fixation of nucleotide substitutions in evolution. Nature 244, 149-154.

Lapage, S.P., P.H.A.Sneath, E.F.Lessel, V.B.D.Skerman, H.P.R. Seeliger und W.A.Clark (eds) (1975): "International Code of Nomenclature of Bacteria - Bacteriological Code". American Society for Microbiology, Washington.

Lazar, I. (1968): Serological relationships of Corynebacteria. J.Gen.Microbiol. 52, 77-88.

Lelliott, R.A. (1966): The plant pathogenic coryneform bacteria. J.Appl.Bacteriol. 29, 114-118.

Lelliott, R.A. (1974): Genus Erwinia; in Buchanan and Gibbons (1974).

Levine, L., J.A.Gordon and W.P.Jencks (1962): The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for deoxyribonucleic acid. Biochemistry 2, 168-175.

De Ley, J. (1969): Compositional nucleotide distribution and the theoretical prediction of homology in bacterial DNA. J.Theoret.Biol.22, 89-116.

De Ley, J. (1971): Hybridization of DNA. In: "Methods in Microbiology", Vol.5A, 311-329 (J.R.Norris and D.W.Ribbons, eds) Academic Press, London.

De Ley, J., R.Tytgat, J.De Smedt and M.Michiels (1973): Thermal stability of DNA/DNA hybrids within the genus Agrobacterium. J.Gen.Microbiol.78, 241-252.

De Ley, J. and K.Kersters (1975): Biochemical evolution in bacteria. In: Comprehensive Biochemistry 29, pp.1-77 (M.Florkin and E.H.Storz, eds) Elsvier Scientific Publishing Company, Amsterdam - London - New York.

De Ley, J. and J. De Smedt (1975): Improvements of the membrane filter method for DNA/rRNA hybridization. Antonie van Leeuwenhoek 41, 287-3o7.

De Ley, J., P.Segers and M.Gillis (1978): Intra- and inter-generic similarities of Chromobacterium and Janthinobacterium ribosomal ribonucleic acid cistrons. Int.J.Syst.Bact.28, 154-168.

Lochhead, A.G. (1958): Soil bacteria and growth promoting substances. Bact.Rev.22, 145-153.

Locker, J. (1979): Analytical and preparative electrophoresis of RNA in agarose-urea. Anal.Biochem.98, 358-367.

Lowry, O.H., N.J.Rosegrough, A.L.Farr and R.J.Randall (1951): Potein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem.193, 265-275.

Mandel, M. and J.Marmur (1968): Use of ultraviolet absorbance temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. In: "Methods in Enzymology", Vol.XII Part B, pp. 195-2o6 (L. Grossman and K.Moldave, eds) Academic Press, New York - London.

Marmur, J. (1961): A procedure for the isolation of deoxy-ribonucleic acid from micro-organisms. J.Mol.Biol. 3, 2o8-218.

Marmur, J., S.Falkow, and M.Mandel (1963a): New approaches to bacterial taxonomy. Annual Rev.Microbiol. 17, 329-365.

Marmur, J., R.Rownd and C.L.Schildkraut (1963b): Denaturation and renaturation of deoxyribonucleic acids. Progr. Nucl.Acid Res.Mol.Biol.1, 231-3oo.

Mathews, C.K. and S.S.Cohen (1963): Inhibition of phage induced thymidylat-synthetase by 5-fluoro-deoxyuridylat. J.Biol.Chem.238, 367-37o.

McCarthy, B.J. and B.L.McConaughy (1968): Related base sequences in the DNA of simple and complex organisms I: DNA/DNA duplex formation and the incidence of partially related base sequences in DNA. Biochem. Genetics 2, 37-53.

McCarthy, B.J. and R.B.Church (197o): The specificity of molecular hybridization reactions. Annual Rev. Biochem.39, 131-15o.

McConaughy, B.L., C.D.Laird and B.J.McCarthy (1969): Nucleic acid reassociation in formamide. Biochemistry 8, 3289-3295.

Meyer, S.A. (1979): Nucleic acid homology within the genus Staphylococcus. Dissertation; Technische Universität, München.

Moore, R.L. and B.J.McCarthy (1967): Comparative study of ribosomal ribonucleic acid cistrons in Enterobacteria and Myxobacteria. J.Bact.94, 1o66-1o74.

Moore, R.L. and B.J.McCarthy (1969): Base sequence homology and renaturation studies of the deoxyribonucleic acid of extremely halophilic bacteria. J.Bact. 99, 255-262.

Moore, W.E.C. and E.P.Cato (1965): Synonymy of Eubacterium limosum and Butyribacterium rettgeri: Butyribacterium limosum comb.nov. Int.Bull.Bacteriol. Nomen. and Taxon.15, 69-8o.

Mordarski, M., M.Goodfellow, A.Tkacz, G.Pulverer and K.P. Schaal (198o): Ribosomal ribonucleic acid similarities in the classification of Rhodococcus and related taxa. J.Gen.Microbiol. 118, 313-319.

Morrison, N.E., A.D.Antoine and E.E.Dewbrey (1965): Synthetic metal chelators, which replace the natural growth factor requirements of Arthrobacter terregens. J.Bact.89, 163o.

O'Donovan, G.A. (1978): Thymidine Metabolism in Bacteria (and "how, or how not, to label DNA"); in: "DNA-Synthesis, Present and Future" (I.Molineux and M.Kohiyama, eds) Plenum Press, New York.

Orla-Jensen, S. (1919): Genus: Microbacterium. In: "The Lactic Acid Bacteria", pp.179-182. Høst, Copenhagen.

Pace, B. and L.L.Campbell (1971): Homology of ribosomal ribonucleic acid of Desulfovibrio species with Desulfovibrio vulgaris. J.Bact.106, 717-719.

Pace, N.R. (1973): Structure and synthesis of the ribosomal ribonucleic acid of procaryotes. Bact.Rev.37, 562-603.

Palleroni, N.J., R.Kunisawa, R.Contopoulou and M.Doudoroff (1973): Nucleic acid homologies in the genus Pseudomonas. Int.J.Syst.Bact.23, 333-339.

Perkins, H.R. and O.S.Cummins (1964): Ornithine and 2,4-diaminobutyric acid as components of the cell walls of plant pathogenic corynebacteria. Nature 201, 1105-1107.

Perkins, H.R. (1967): The use of photolysis of dinitrophenyl-peptides in structural studies on the cell-wall mucopeptide of Corynebacterium poinsettiae. Biochem.J.102, 296-326.

Perkins, H.R. (1968): Cell wall mucopeptide of Corynebacterium insidiosum and Corynebacterium sepedonicum. Biochem.J.110, 47P-48P.

Reich, C.V. and J.H.Hanks (1964): Use of Arthrobacter terregens for bioassay of mycobactin. J.Bact. 87, 1317-1320.

Rhuland, L.E., E.Work, R.F.Deham and D.S.Hoare (1955): The behaviour of the isomers of α,ε-diaminopimelic acid on paper chromatograms. J.Amer. Chem.Soc.77, 4844-4846.

Robinson, K. (1966): An examination of Corynebacterium species by gel electrophoresis. J.Appl.Bact. 29, 179-184.

Rogosa, M., C.S.Cummins, R.A.Lelliott, and R.M.Keddie (1974): Coryneform group of bacteria; in Buchanan, R.E. and N.E.Gibbons (1974).

Schildkraut, C.L. and S.Lifson (1965): Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. Biopolymers 3, 195-208.

Schleifer, K.H. und O.Kandler (1967): Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I: Zur Aminosäuresequenz des Mureins von Str.thermophilus und Str. faecalis. Arch.Mikrobiol. 57, 335-365.

Schleifer, K.H., R.Plapp, and O.Kandler (1967): Identification of threo-3-hydroxyglutamic acid in the cell wall of Microbacterium lacticum. Biochem.Biophys.Res. Commun. 28, 566-570.

Schleifer, K.H., R.Plapp und O.Kandler (1968): Die Aminosäuresequenz des Mureins von Microbacterium lacticum. Biochim.Biophys.Acta 154, 573-582.

Schleifer, K.H. (197o): Die Mureintypen der Gattung Microbacterium. Arch.Mikrobiol.71, 271-282.

Schleifer, K.H. and O.Kandler (1972): Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bact.Rev.36, 4o7-477.

Schwarz, Z. and H.Kössel (198o): The primary structure of 16S-rDNA from Zea mays chloroplast is homologous to E.coli 16S-rRNA. Nature 283, 739-742.

Seiler, H., G.Ohmayer und M.Busse (1977): Taxonomische Untersuchungen an grampositiven coryneformen Bakterien unter Anwendung eines EDV-Programms zur Berechnung von Vernetzungsdiagrammen. Zbl.Bakt.Hyg.I Abt. Orig.A 238, 475-488.

Da Silva, G.A.N. and J.G.Holt (1965): Numerical taxonomy of certain coryneform bacteria. J.Bact.9o, 921-927.

De Smedt, J. and J. De Ley (1977): Intra- and intergeneric similarities of Agrobacterium ribosomal ribonucleic acid cistrons. Int.J.Syst.Bact.27, 222-24o.

De Smedt, J.M.Bauwens, R.Tytgat and J. De Ley (198o): Intra- and intergeneric similarities of ribosomal ribonucleic acid cistrons of free-living, nitrogen-fixing bacteria. Int.J.Syst.Bact.3o, 1o6-122.

Sneath, P.H.A. and D.Jones (1976): Brochothrix, a new genus tentatively placed in the family Lactobacillaceae. Int.Journ.Syst.Bact.26, 1o2-1o4.

Stackebrandt, E. and F.Fiedler (1979): DNA-DNA homology studies among strains of Arthrobacter and Brevibacterium. Arch.Microbiol. 120, 289-295.

Stackebrandt, E., and O.Kandler (1979): Taxonomy of the genus Cellulomonas, based on phenotypic characters and deoxyribonucleic acid homology, and proposal of seven neotype strains. Int.J.Syst.Bact.29, 273-282.

Stackebrandt, E. and C.R.Woese (1979): A phylogenetic dissection of the family Micrococcaceae. Current Microbiology 2, 317-322.

Stackebrandt, E. (1980): Die Evolution der ribosomalen 16S RNS: Neue Aspekte zur Phylogenie der Prokaryonten. Habilitationsschrift; Technische Universität, München.

Stackebrandt, E., M.Häringer, and K.H.Schleifer (1980a): Molecular genetic evidence for the transfer of Oerskovia species into the genus Cellulomonas. Arch.Microbiol.127, 179-185.

Stackebrandt, E., B.J.Lewis and C.R.Woese (1980b): The phylogenetic structure of the coryneform group of bacteria. Zbl.Bakt.Hyg, I.Abt.Orig.C 1, 137-149.

Stackebrandt, E., B.Wunner-Füssl, V.J.Fowler, and K.H.Schleifer (1981): Molecular genetic relatedness of sporeforming actinomycetes. I. Deoxyribonucleic acid homologies and ribosomal ribonucleic acid similarities. Int.J.Syst.Bact., zur Veröffentlichung eingereicht.

Stackebrandt, J. (1977): DNS/DNS-Homologie an Lactobacillen der Untergattung Streptobacterium. Zulassungsarbeit; Universität München.

Stanier, R.Y., E.A.Adelberg and J.L.Ingraham (1976): "The Microbial World", 4th ed. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Yersey.

Starr, M.P. (1949): The nutrition of phytopathogenic bacteria. III: The Gram-positive phytopathogenic Corynebacterium species. J.Bact.57, 253-258.

Starr, M.P. (1959): Bacteria as plant pathogens. Annual Rev. Microbiol. 13, 211-238.

Starr, M.P., M.Mandel and N.Murata (1975): The phytopathogenic coryneform bacteria in the light of DNA base composition and DNA/DNA-segmental homology. J.Gen. Appl.Microbiol.21, 13-26.

Strobel, G.A. (197o): A phytotoxic glycopeptide from potato plants infected with Corynebacterium sepedonicum. J.Biol.Chem.245, 32-38.

Takahashi, H., H.Saito and Y.Ikeda (1967): Species specifity of the ribosomal RNA cistrons in bacteria. Biochim. Biophys.Acta 134, 124-133.

Tanner, R.S., E.Stackebrandt, G.E.Fox and C.R.Woese (1981): A phylogenetic analysis of Acetobacterium woodii, Closterium barkeri, Clostridium butyricum, Clostridium lituseburense, Eubacterium limosum and Eubacterium tenue. Current Microbiology 5, 35-38.

Wetmur, J.G. and N.Davidson (1968): Kinetics of renaturation of DNA. J.Mol.Biol.31, 349-37o.

Wilkinson, B. and D.Jones (1977): A numerical taxonomic survey of Listeria and related bacteria. J.Gen.Microbiol. 98, 399-421.

Woese, C.R. (1961): Composition of various ribonucleid acid fractions from micro-organisms of different deoxyribonucleic acid composition. Nature, 189, 92o-921.

Yamada, K. and K.Komagata (197o): Taxonomic studies on Coryne-bacteria. III: DNA base composition of coryneform bacteria. J.Gen.Appl.Microbiol.16, 215-224.

Yamada, K. and K.Komagata (1972): Taxonomic studies on coryneform bacteria. V: Classification of coryneform bacteria. J.Gen.Appl.Microbiol. 18, 417-431.

Yamada, Y., G.Inouye, Y.Tahara and K.Kondo (1976): The menaquinone system in the classification of coryneform bacteria and related organisms. J.Gen.Appl.Microbiol.22, 2o3-214.

Yankofsky, S. and S.Spiegelman (1963): Distinct cistrons for the two ribosomal RNA components. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 49, 538-544.

Zagallo, A.C. and C.H.Wang (1967): Comparative carbohydrate cata-bolism in Corynebacteria. J.Gen.Microbiol.47, 347-357.

Zajic, J.E., J.De Ley and M.P.Starr (1956): Oxidative metabolism of Corynebacterium insidiosum. Bacteriol.Proc. 1956, 116.

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof.Dr.F.Fiedler von 1977 bis 1981 angefertigt.

Herrn Prof.Fiedler danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und seine wertvolle Unterstützung.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr.E.Stackebrandt für viele anregende Diskussionen und praktische Hinweise danken, sowie Herrn Prof.Dr.K.H.Schleifer für die Möglichkeit, einen Teil meiner Versuche an der Technischen Universität München durchzuführen.

Schließlich gilt mein Dank auch allen kollegialen Mitarbeitern.Frau Lore Hagner, Frau Ingrid Pomper und Frau Ursula Hamker danke ich für ihre freundliche Unterstützung bei der Durchführung einiger Versuche.

L e b e n s l a u f

Name	Hannelore Döpfer
Geburtsdatum	24.1.1953
Geburtsort	Nürnberg
Eltern	Kurt Döpfer und Waltraud Döpfer, geb.Heider

Schulausbildung

September 1959 bis Juli 1963	Volksschule in Nürnberg
September 1963 bis Juni 1972	Labenwolfgymnasium (neusprachlicher Zweig) in Nürnberg
Juni 1972	Abitur

Studium

WS 1972/73 bis WS 1976/77	Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt am Gymnasium an der Universität München
Mai 1977	Abschluß des Staatsexamens (wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt am Gymnasium)

Promotion

September 1977	Beginn der Doktorarbeit unter der Leitung von Prof.Dr.Franz Fiedler, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München
September 1977 bis Dezember 1978	Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität München
ab Januar 1979	Anstellung als vollbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität München